

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais não incluídas pela autora no arquivo original.

Queiroz, Brigida Pimentel Villar de Queiroz. Isolamento e seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e controle de *Phytophthora parasitica* em citros / Rio Claro : 120 f., 2003 Tese

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | 4 |
| ABSTRACT | 6 |
| INTRODUÇÃO | 8 |
| <hr/> | |
| Capítulo 1 | 10 |
| APLICAÇÕES DE RIZOBACTÉRIAS NA AGRICULTURA: Uma Revisão | 10 |
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.2. RIZOBACTÉRIAS: Descrição e Aplicação | 15 |
| 1.2.1. Efeito de Rizobactérias na promoção de crescimento de plantas | 16 |
| 1.2.2. Rizobactérias no controle de fitopatógenos | 18 |
| 1.3. MECANISMOS DE AÇÃO DAS RIZOBACTÉRIAS | 19 |
| 1.3.1. Produção de Compostos Inibitórios | 20 |
| 1.3.2. Competição por Nutrientes | 22 |
| 1.3.3. Parasitismo e Predação | 23 |
| 1.3.4. Indução de resistência sistêmica | 25 |
| 1.4. UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NA CITRICULTURA | 26 |
| 1.5. IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Phytophthora</i> NA CITRICULTURA | 27 |
| 1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| <hr/> | |
| Capítulo 2 | 38 |
| POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE RIZOBACTÉRIA A <i>Phytophthora parasitica</i> | 38 |
| RESUMO | 39 |
| ABSTRACT | 40 |
| 2.1. INTRODUÇÃO | 41 |
| 2.2. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 2.2.1. Isolamento e seleção de antagonista | 43 |
| 2.2.2. Microrganismos | 43 |
| 2.2.3. Teste de Patogenicidade..... | 44 |
| 2.2.4. TESTES PRELIMINARES | 45 |
| 2.2.4.1. Determinação do Volume | 45 |
| 2.2.4.2. Formulações do metalaxil..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.3. Concentração do ágar..... | 46 |
| 2.2.5. TESTE DE ANTAGONISMO | 46 |
| 2.2.5.1. Cultura pareada | 46 |
| 2.2.5.2. Quantificação da inibição | 46 |
| 2.2.5.3. Porcentagem de inibição micelial | 47 |
| 2.2.5.4. Parasitismo | 47 |
| 2.3. RESULTADOS | 48 |
| 2.3.1. TESTES PRELIMINARES | 48 |
| 2.3.1.1. Determinação do volume da gota | 48 |
| 2.3.1.2. Formulações..... | 49 |
| 2.3.1.3. Concentração do Ágar | 49 |
| 2.3.1.4. Concentração do Metalaxil | 50 |
| 2.3.2. TESTE DE ANTAGONISMO COM AS RIZOBACTÉRIAS..... | 51 |
| 2.3.2.1. Quantificação da inibição | 57 |
| 2.4. CONCLUSÕES | 60 |
| 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |
| <hr/> Capítulo 3 | 64 |
| COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE CITROS POR RIZOBACTÉRIAS | 64 |
| RESUMO | 65 |
| ABSTRACT | 66 |
| 3.1. INTRODUÇÃO | 67 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS | 68 |
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 70 |
| 3.4. CONCLUSÃO | 77 |
| 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| <hr/> Capítulo 4 | 81 |
| RIZOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CITROS | 81 |
| RESUMO | 82 |
| ABSTRACT | 83 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 84 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS | 86 |
| 4.2.1. Microrganismos utilizados e métodos de preservação..... | 86 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.2. Bacterização das Sementes | 87 |
| 4.2.3. Experimentos | 88 |
| 4.2.4. Avaliação | 88 |
| 4.2.5. Análise estatística e delineamento experimental | 88 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 89 |
| 4.4. CONCLUSÕES | 94 |
| 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| Capítulo 5 | 98 |
| <hr/> | |
| CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Phytophthora parasitica</i> POR RIZOBACTÉRIAS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS | 98 |
| RESUMO | 99 |
| ABSTRACT | 100 |
| 5.1. INTRODUÇÃO | 101 |
| 5.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 103 |
| 5.2.1. Isolamento e seleção de antagonista | 103 |
| 5.2.2. Microrganismos utilizados nos ensaios e métodos de preservação | 103 |
| 5.2.3. Teste de Patogenicidade..... | 104 |
| 5.2.4. Produção de inóculo de <i>Phytophthora parasitica</i> | 105 |
| 5.2.5. Bacterização das Sementes e Raízes..... | 105 |
| 5.2.6. Experimento 1 | 107 |
| 5.2.7. Experimento 2..... | 107 |
| 5.2.8. Teste de isca para confirmação da presença do patógeno | 107 |
| 5.3. RESULTADOS..... | 109 |
| 5.3.1. Experimento 1 | 109 |
| 5.3.2. Experimento 2..... | 112 |
| 5.3.3. Teste da isca para confirmação da presença do patógeno | 114 |
| 5.4. CONCLUSÃO | 115 |
| 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 118 |

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE *Phytophthora parasitica* EM CITROS

RESUMO

As rizobactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento de plantas vêm sendo testadas em diversas culturas, tais como tomate, feijão, entre outras. Com o objetivo de selecionar rizobactérias eficientes em colonizar, estimular o crescimento e proteger plântulas de limão cravo (*Citrus limonia*) contra *Phytophthora parasitica*, treze rizobactérias foram testadas *in vitro* e *in vivo*. Foram incluídas como padrões as bactérias *Bacillus subtilis* (OG) e *Pseudomonas putida* (Santa Barbara). Para confirmar a capacidade de colonizar as radículas cítricas, sementes bacterizadas foram germinadas em tubos de ensaio com os meios Phytigel, ágar-noble ou ágar-ágar e a turbidez do meio foi utilizada como indicativo da colonização da rizosfera pelas bactérias. As radículas foram visualizadas em microscopia eletrônica de varredura e a presença no rizoplane foi correlacionada com a rizosfera. Os testes de antagonismos foram feitos nos meios King B (KB), batata dextrose ágar (BDA) e cenoura ágar (CA). Foi proposto também, a utilização de um referencial químico estável (metalaxil), paralelamente aos testes de antagonismo, com o propósito de quantificar o potencial de inibição dos isolados. O isolado de *Paenibacillus polymyxa* inibiu acentuadamente o patógeno nos três meios testados. Foi observado também, o parasitismo de *Serratia marcescens* sobre as hifas de *P. parasitica* em meio KB. A capacidade de promoção de crescimento das plântulas de citros foi conduzida em três tipos de substratos: solo solarizado, substrato comercial (Plantmax®) autoclavado e substrato comercial não esterilizado. No primeiro experimento, todos os tratamentos favoreceram o desenvolvimento da plântula de citros, diferindo apenas do controle negativo (Esc), quando comparados com a testemunha. No segundo, os isolados de *Pseudomonas* (Psp1, Psf1 e Psf2) aumentaram a massa da matéria seca, tanto da parte aérea quanto das raízes. Já no terceiro, não foi observada diferença estatística entre os parâmetros avaliados, tais como altura da parte aérea, comprimento da raiz e peso da matéria seca da parte aérea e raiz, em relação ao controle.

O ensaio de controle biológico (*in vivo*) foi conduzido em dois experimentos: no primeiro foi utilizado o substrato comercial (Plantmax®) autoclavado, com a bacterização aplicada às raízes; e, no segundo utilizou-se o mesmo substrato mas sem esterilização, com bacterização nas sementes. No primeiro experimento, houve diferença significativa em relação a massa do peso seco da parte aérea e raiz principal e níveis de severidade da doença em relação ao controle. Enquanto que, no segundo não houve diferença estatística nos parâmetros avaliados. Entretanto, os níveis de podridão radicular foi variável entre os isolados. Os isolados que mais se destacaram como agente de biocontrole foram: *Bacillus subtilis* (OG); *Pseudomonas fluorescens* (C1/SNa); *Paenibacillus polymyxa* (3-4) e *Serratia marcescens* (R3-5).

ISOLATION AND SELECTION OF RHIZOBACTERIA FOR CITRUS GROWTH PROMOTION AND *Phytophthora parasitica* CONTROL

ABSTRACT

Rhizobacteria that act as biocontrol agents and promote plant growth have been tested in many crops, such as tomato and bean, among others. In order to select rhizobacteria that are efficient in colonizing, stimulating growth and protecting Cravo lemon seedlings (*Citrus limonia*) against *Phytophthora parasitica*, thirteen rhizobacteria species were tested *in vitro* and *in vivo*. The bacteria *Bacillus subtilis* (OG) and *Pseudomonas putida* (Santa Barbara) were included in the experiment as standards. The bacterized seeds were placed to germinate inside test tubes containing the media Phytigel, noble agar or agar agar in order to confirm their citrus-radicle colonizing ability; turbidity in the medium was utilized as an indication of rhizosphere colonization by the bacteria. The radicles were visualized under the scanning electron microscope and their presence in the rhizoplane was correlated with the rhizosphere. Antagonism tests were carried out using King B (KB), potato dextrose agar (PDA) and carrot agar (CA) media. The utilization of a stable chemical reference (metalaxyl) was also proposed, concurrently with the antagonism tests, in order to quantify the inhibition potential of the isolates. The *Paenibacillus polymyxa* isolate distinctly inhibited the pathogen in the three tested media. Parasitism of *Serratia marcescens* on *P. parasitica* hyphae in the KB medium was also observed. Tests involving the ability to promote citrus seedling growth were conducted on three types of substrates: solarized soil, autoclaved commercial substrate (Plantmax®) and non-sterilized commercial substrate. In the first experiment, all treatments encouraged citrus seedling development, only differing from the negative control (Esc), when compared with the control. In the second experiment, the *Pseudomonas* isolates (Psp1, Psf1 and Psf2) caused an increase in dry matter mass, both in the aerial part and in the roots. In the third, however, no statistical difference was observed between the evaluated parameters, such as height of the aerial part, root length and dry matter weight of the aerial part and roots, relative to the control.

The biological control assay (*in vivo*) was conducted by means of two experiments: in the first, an autoclaved commercial substrate (Plantmax®) was utilized, with bacterization applied to the roots; in the second, the same substrate was utilized, without sterilization,

and bacterization was done in the seeds. In the first experiment, there was a significant difference with regard to dry weight mass in the aerial part and main root, and severity of the disease levels, relative to the control. In the second experiment, nonetheless, there were no statistical differences with respect to the parameters evaluated. However, the observed root rot levels were variable between isolates. The isolates showing the most prominent behavior as biocontrol agents were: *Bacillus subtilis* (OG); *Pseudomonas fluorescens* (C1/SNa); *Paenibacillus polymyxa* (3-4) and *Serratia marcescens* (R3-5).

INTRODUÇÃO

A agricultura atual, além de estar preocupada com a produção de alimentos, busca otimizar a utilização de insumos agrícolas, minimizando os impactos ambientais e ao mesmo tempo, melhorando a qualidade de vida e a saúde do consumidor no final da cadeia do agronegócio. O uso de defensivos agrícolas vem sendo indicado no manejo de pragas e doenças somente quando estritamente necessário, tendo sido proibidos nos últimos anos vários princípios ativos que possam ser prejudiciais à saúde do consumidor e ao ambiente. Este novo modelo está sendo altamente favorável à introdução de agentes de controle biológico de pragas e patógenos, bem como, de microrganismos que favoreçam o crescimento das plantas, seja pelo aumento na disponibilidade de nutrientes ou pela produção de hormônios vegetais.

As rizobactérias, na maioria, são bactérias benéficas que colonizam agressivamente o sistema radicular e que interagem com as plantas pela produção de fitohormônios ou pela alteração da própria comunidade microbiana presente no ambiente. Elas têm um potencial de uso muito grande por terem características apropriadas para as mudanças que estão ocorrendo no novo panorama agrícola. Formulações comerciais têm sido lançadas no mercado para tentar ocupar ou suprir a atual demanda por produtos alternativos. O desenvolvimento de novos produtos depende da seleção e avaliação destes microrganismos em condições específicas, já que pode variar de acordo com a cultura e as condições edafoclimáticas.

A citricultura é extremamente importante para o Brasil, tanto pela geração de divisas, como de empregos. A necessidade de adaptação às tendências de produção de plantas saudáveis levou a elaboração de uma nova legislação de certificação de mudas cítricas. O material de propagação deve ser isento de patógenos do solo. *Phytophthora* é o principal patógeno de solo e está amplamente disseminado na citricultura paulista, havendo necessidade de que no período de plantio, além de isentas, as mudas sejam protegidas contra este fitopatógeno. Dessa forma, este trabalho teve os seguintes objetivos: 1) isolar novas linhagens de rizobactérias a partir de solos supressivos a *Phytophthora parasitica*; 2) caracterizar as bactérias selecionadas quanto ao potencial em inibir *in vitro* o patógeno; 3)

avaliar a colonização do sistema radicular de citros pelas rizobactérias selecionadas; 4) avaliar o potencial de rizobactérias em promover o crescimento de plântulas de citros; 5) avaliar o potencial de rizobactérias em controlar ou reduzir a podridão radicular de *P. parasitica* em citros, em condições controladas.

**APLICAÇÕES DE RIZOBACTÉRIAS NA
AGRICULTURA: Uma Revisão**

APLICAÇÕES DE RIZOBACTÉRIAS NA AGRICULTURA: Uma Revisão

RESUMO

Diversos fatores, principalmente, ambientais e econômicos, têm pressionado a comunidade científica a desenvolver estratégias alternativas ao uso de agrotóxico para o controle ou prevenção de fitopatógenos. Este capítulo descreve sucintamente um histórico da evolução do conhecimento sobre as rizobactérias, descrevendo o seu habitat e interação benéfica ou não com as plantas hospedeiras. As rizobactérias são definidas como colonizando o sistema radicular e a rizosfera, sendo que são enfatizadas as agrupadas pelos seus efeitos, no crescimento das plantas como “Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas – RPCP” e como agentes de controle biológico. Os mecanismos relacionados às RPCP é relacionadas a produção de fitohormônios, desfavorecimento de populações deletérias e disponibilização de nutrientes. Enquanto, os agentes do controle biológico estão relacionados à produção de compostos inibitórios, competição de nutrientes, parasitismo e indução de resistência sistêmica. Além disso, serão discutidos os benefícios obtidos pela introdução de rizobactérias em culturas anuais e perenes, principalmente na citricultura e no controle de *Phytophthora*.

Termos de indexação: RPCP, rizosfera, citros.

APPLICATIONS OF RHIZOBACTERIA IN AGRICULTURE: A Review

ABSTRACT

Several factors, mostly environmental and economical, have pressed the scientific community to develop alternative strategies to using agrochemicals to control or prevent against plant pathogens. This chapter briefly presents a history of the knowledge evolution on rhizobacteria, describing their habitat and beneficial interactions, or not, with host plants. Rhizobacteria are defined as root system and rhizosphere colonizers, and emphasis is given to those classified, because of their effects on plant growth, as “Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria – PGPR”, and as biological control agents. The PGPR-related mechanisms involve the production of plant hormones, as well as negative effects on deleterious populations and making nutrients available. When rhizobacteria are considered as biological control agents, related mechanisms involve the production of inhibitory compounds, competition between nutrients, parasitism and systemic resistance induction. In addition, the benefits obtained with the introduction of rhizobacteria into annual and perennial crops are discussed, especially in citriculture and in the control of *Phytophthora*.

Index Terms: PGPR, rhizosphere, citrus.

1.1. INTRODUÇÃO

O uso de fungicidas tem sido o método mais comumente usado para o controle de fungos fitopatogênicos. Isso devido a vários fatores, tais como, a facilidade de obtenção do produto e os resultados, geralmente imediatos da aplicação desses produtos. No entanto, o uso cada vez mais freqüente dos fungicidas tem promovido a seleção de fungos resistentes aos ingredientes ativos, reduzindo sua eficiência e dificultando o controle do patógeno. A resistência de diferentes organismos a estas moléculas tem sido um grande problema para a manutenção da eficiência no controle de diversas doenças de plantas (GHINI; KIMATI, 2000).

Além desse problema, fatores econômicos e ambientais têm pressionado a comunidade científica a desenvolver alternativas para o controle ou mesmo a prevenção do estabelecimento do patógeno. Nesse sentido, a utilização de microrganismos para controlar patógenos tem merecido cada vez mais atenção e credibilidade. Já existem trabalhos que demonstraram o sucesso de microrganismos no controle de *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 1996). Dentre esse microrganismos encontram-se: bactérias, *Pseudomonas* e *Bacillus*; actinomicetos, *Streptomyces* e fungos, *Aspergillus*, *Catenaria*, *Gliocladium*, *Hyphochytrium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Pythium* e *Trichoderma* (ERWIN; RIBEIRO; 1996).

Os microrganismos que habitam a rizosfera têm sido bastante estudados, porque neste habitat, a atividade microbiana, a quantidade e o tipo de exsudados são diferentes do solo não rizosférico, acarretando uma maior diversidade de populações de bactérias, fungos, protozoários e nematóides. Nesta região, os fatores físicos-químicos também diferem, tais como acidez, umidade, disponibilidade de nutrientes, condutividade elétrica e potencial redox (LYNCH, 1990). Os microrganismos podem interagir com os componentes do ambiente das raízes, alterando-os e gerando efeitos benéficos, deletérios ou neutros às plantas.

Os microrganismos benéficos podem influenciar o crescimento de plantas através do aumento da disponibilidade de nutrientes minerais (KAVIMANDAN; GAUR, 1971; LIFSHITZ et al., 1987), da produção de hormônios do crescimento como giberelinas e auxinas (KATZNELSON; COLEM, 1965; BROWN, 1972) e da supressão de

microrganismos deletérios da rizosfera de plantas (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Entre as rizobactérias, as benéficas são as mais estudadas.

O conceito de rizosfera foi primeiramente definido por Hiltner, em 1904, como sendo a zona ao redor das raízes das plantas, contendo nutrientes liberados por elas e colonizadas por microrganismos. A constante liberação de nutrientes orgânicos tais como, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, hormônios entre outras, fornece ótimas condições para o crescimento e atividades de microrganismos (KLUEPFEL, 1993). O termo rizobactéria foi designado por Kloepper & Schroth (1978); citado por Schroth & Becker (1990) para descrever bactérias que colonizam agressivamente as raízes de plantas e para diferenciá-las dos habitantes naturais encontrados nos outros espaços.

A microbiota da rizosfera é bastante variada, sendo colonizada principalmente por bactérias gram-negativas, não esporuladas e flageladas, especialmente as *Pseudomonas* fluorescentes (Vancura, 1980; Bruehl, 1987). Esse grupo é o mais indicado como agente do biocontrole pela sua capacidade de colonizar as raízes das plantas (HOWELL; STIPANOVIC, 1980; WELLER; COOK, 1983). Visto que, a colonização de raízes é de fundamental importância para o uso de microrganismos como agentes de controle de fitopatógenos, principalmente do solo (Melo, 1998).

O genótipo das plantas influi na quantidade e composição dos exsudados, os quais afetam a colonização, tipo de população e atividade do agente de biocontrole (BUCHENAUER, 1998). Em citros, constatou-se que a compatibilidade da rizobactéria com a planta hospedeira é de suma importância para a inibição de microrganismos deletérios, promovendo portanto, um aumento do crescimento da planta (GARDNER et al., 1984).

Várias têm sido as revisões sobre bactérias como agentes de biocontrole de fitopatógenos, tais como a de Robbs (1991) e Melo (1998), e sobre as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, como as de Luz (1996), Kapulnik (1991) e Buchenauer (1998).

1.2. RIZOBACTÉRIAS: Descrição e Aplicação

Com o objetivo de aumentar o crescimento e o rendimento das plantas, foram iniciadas pesquisas com as rizobactérias não simbióticas, inicialmente na Rússia e na Ucrânia em 1885, com *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies de *Bacillus*. Na época muitos trabalhos foram contestados devido aos métodos usados e a falta de identificação do mecanismo envolvido que justificassem os resultados (MISHUSTIN; NAUMOVA, 1962, citado por SCHROTH; BECKER, 1990). Na Rússia, na década de 50, foram aplicados os primeiros fertilizantes bacterianos não simbiotes (LUZ, 1996). Nas duas décadas seguintes, pesquisadores indianos utilizaram inoculantes bacterianos, mas com outros isolados, e confirmaram os trabalhos soviéticos sobre o aumento de rendimento e promoção do crescimento das plantas.

Mais tarde, Brown & Burlinghan (1968) trabalhando com *Azotobacter* sp. observaram a presença dos ácidos giberélico e indol-acético *in vitro*, e sugeriram serem responsáveis pelo efeito benéfico no crescimento das plantas. Brown (1972) trabalhando com bactérias do rizoplano e da rizosfera de trigo observou, através de cromatografia, que muitas bactérias produziram reguladores de crescimento do tipo giberelinas e auxinas, quando crescidas em meio líquido.

Os conhecimentos acumulados sobre os efeitos de certas bactérias em estimular o crescimento de plantas deram maior credibilidade aos trabalhos. Entretanto, somente com os trabalhos de Burr et al. (1978), em batata, e de Kloepper & Schroth (1978), em rabanete, ficou estabelecido o conceito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). A partir desses trabalhos, houve um crescimento nas investigações com vários tipos de culturas (SCHIPPERS et al., 1987; HAGEDORN et al., 1989; HANDELSMAN et al., 1990; UTKHEDE et al., 1999) iniciando o interesse de algumas indústrias americanas nas RPCP.

Os microrganismos benéficos, simbiotes ou não, podem influenciar o crescimento de plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes (LIFSHITZ et al. 1987), da produção de hormônios do crescimento, tais como giberelinas e auxinas (BROWN, 1972) e da supressão de microrganismos deletérios da rizosfera de plantas (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Entre os microrganismos benéficos, as rizobactérias, assim chamadas por colonizarem agressivamente o sistema radicular, têm sido as mais estudadas. Entre as

espécies mais estudadas podem ser citadas: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter* (KAPULNIK, 1991; MELO, 1998).

As denominações utilizadas para as rizobactérias que têm sido descritas são: Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP ou *PGPR*), as que promovem o crescimento de plantas; Rizobactérias Promotoras de Nodulação (RPN ou *NPR*), as que influenciam a nodulação; Rizobactérias Promotoras de Emergência (RPE ou *EPR*), as que influenciam a emergência das plantas, (KLOEPPER et al., 1988; HÖFTE et al., 1991; MELO; LUCON, 1995) e Rizobactérias Deletérias (RD ou *DR*) ou Microrganismos Rizosféricos Deletérios (MRD ou *DRMO*), as que são deletérias ao crescimento das plantas, mas não são parasítica, (SCHIPPERS et al., 1987).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas do gênero *Pseudomonas* spp. são as mais bem estudadas, devido aos seguintes fatores: elevada população no solo, versatilidade nutricional, por crescerem numa ampla faixa de condições ambientais; e principalmente, por sua capacidade de suprimir patógenos (MELO, 1998). A grande variedade de enzimas, antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal produzidos por *Pseudomonas fluorescens* tem gerado um enorme interesse de pesquisadores de muitos países, na busca intensa por novos compostos biotecnológicos.

1.2.1. Efeito de Rizobactérias na promoção de crescimento de plantas

Nas últimas três décadas houve um aumento de pesquisas envolvendo microrganismos da rizosfera que promovem algum efeito benéfico às plantas. Algumas bactérias promotoras do crescimento e aumento da produção de plantas agem diretamente, estimulando o crescimento da planta, ou indiretamente, modificando o ambiente da rizosfera (KAPULNIK, 1991).

Uma das importantes características para uma bactéria ser denominada como uma RPCP é sua capacidade em colonizar e persistir na rizosfera após sua introdução, bem como de efetivamente colonizar o rizoplano das raízes. Esta última característica tem um efeito fisiológico direto sobre o crescimento da planta (SUSLOW; SCHROTH, 1982).

A presença de outros microrganismos no solo, principalmente os deletérios, pode influenciar a habilidade do inoculante rizobacteriano em promover o crescimento da planta. Isto poderá ser causado pela redução da colonização das raízes por esses agentes ou pela interferência nos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento, mediadas pelas rizobactérias (BENT et al., 2001). Estes autores observaram a promoção do crescimento de pinho (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud) com dois isolados de *Paenibacillus polymyxa*, de modo isolado; mas quando os aplicou em conjunto, não houve efeito no crescimento. Gardner, et al. (1984) demonstraram a promoção do crescimento de planta de citros utilizando rizobactérias. Constataram que a compatibilidade da rizobactéria com a planta hospedeira é tão importante e necessário quanto a produção de antibióticos na promoção do crescimento, inibindo microrganismos deletérios.

Pesquisadores trabalhando com abeto (*Picea glauca*) e outros híbridos, constataram que todos os isolados produziram aumento do crescimento das plantas, tanto em casa de vegetação quanto em campo. Quando as plântulas eram tratadas antes do transplântio, os resultados de campo mostraram-se mais significativos (SHISHIDO; CHANWAY, 2000).

A produção de fitohormônios, por rizobactérias, já foi constatada em plantas cítricas, como o ácido indolacético (AIA) em concentrações de até 150 μM (BALOTA; KANASHIRO, 1998), à semelhança do que ocorre em outras culturas. Estes autores concluíram que este potencial ainda tem sido pouco explorado, e que no manejo do pomar, a sua utilização seria altamente benéfica, especialmente na produção de mudas e no favorecimento dessas populações. Foi observado um aumento na produção de AIA em pinho (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud) inoculado com *Paenibacillus polymyxa* (BENT et al. 2001).

A maioria das pesquisas com RPCP são direcionadas para a agricultura, seu uso em culturas perenes, inclusive em árvores de reflorestamento, tem alcançado resultados promissores (ENEBACK et al., 1998; CHANWAY, 1998; GARNER et al., 1984).

1.2.2. Rizobactérias no controle de fitopatógenos

Patógenos de solo causam sérios danos econômicos às principais culturas, sendo considerados um dos fatores limitantes para a saúde das plantas e para a produção em termos qualitativos e quantitativos.

Os substratos ou solos utilizados em viveiros, geralmente, são tratados com produtos químicos fumigantes como brometo de metila, ou via calor (120°C). Em ambos os casos, esses tratamentos eliminam a microflora benéfica do solo tais como: fungos micorrízicos, microrganismos antagonísticos, RPCP e prejudicam a germinação de sementes (FEICHTENBERGER, 1996).

A solarização tem sido uma das alternativas para tratar substratos de viveiros e áreas no campo. Esta técnica consiste em um método físico de desinfestação do solo para o controle de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas, na qual um plástico transparente cobre o solo úmido em pré-plantio, durante o período do ano de maior radiação solar (KATAN, 1980). Existem ainda, coletores solares para tratamento de substratos para viveiros. Com esta técnica parte da população de fitopatógenos é inibida ou eliminada pela exposição à altas temperaturas. Três espécies de *Phytophthora* foram inativadas em solos solarizados (JUAREZ-PALACIOS et al. 1991). Katan (1981) descreve que os microrganismos saprófitas, entre os quais muitos são antagonistas, são mais tolerantes ao calor do que os fitopatógenos. A microbiota que resiste a este tratamento, beneficia o controle de patógenos e a disponibilização de nutrientes às plantas. Sinigaglia et al. (2001) citam vários trabalhos em que se constatou benefícios com a solarização que, além do controle de fitopatógenos, promoveu um maior crescimento das plantas. Estes mesmos autores comprovaram a eficiência da solarização como método alternativo ao emprego dos métodos químicos convencionais, no manejo da cultura de alface.

Outra alternativa tem sido o tratamento do substrato com bactérias benéficas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e a microbiolização de sementes, como forma de aumentar a competitividade destes microrganismos benéficos quando transplantados para o campo. Entretanto, grande variedade de fatores está envolvida na ineficácia das rizobactérias como agente de biocontrole, considerando as complexas interações entre a planta hospedeira, patógenos, antagonista e ambiente (BUCHENAUER,

1998). Este mesmo autor descreve que um agente de biocontrole deve ser capaz de, rapidamente, multiplicar-se na presença de fungicidas e de competir com outros organismos na espermosfera e na rizosfera.

O fungo do gênero *Phytophthora* apresenta geralmente, baixa competitividade com outros microrganismos de solo (FEICHTENBERGER, 1996). A utilização de microrganismos rizosféricos antagônicos poderá ser um dos métodos alternativos para o controle desse patógeno de solo, já que o controle químico ainda tem sido o método rotineiramente empregado para o controle desse patógeno. Entretanto, o manejo integrado para aumentar a eficiência na proteção da planta contra fitopatógenos, ainda é o mais indicado.

A utilização de microrganismos como agente de biocontrole, tem sido frequentemente questionada em relação aos resultados de testes em laboratórios, quando comparados com os resultados em casa de vegetação e em campo. Os resultados dos testes de laboratório podem ser utilizados como indicativo para a seleção de um possível agente de biocontrole. Entretanto, nem sempre os testes de antibiose *in vitro* indicarão o controle em condições naturais, mas o inverso também é verdadeiro. Tratamentos com rizobactérias contra *Pythium aphanidermatum*, quando inibiram *in vitro*, não tiveram atividade inibitória no ensaio em casa-de-vegetação. O contrário também pode ocorrer, ou seja, uma linhagem de *Bacillus subtilis* não demonstrou antibiose *in vitro*, mas teve um bom desempenho em casa de vegetação (UTKHEDE et al. 1999). Já, Yang et al. (1994) obtiveram sucesso no biocontrole de *P. parasitica* em citros com *Pseudomonas fluorescens*. A Tabela 1 mostra alguns exemplos do controle biológico de fitopatógenos utilizando-se rizobactérias.

1.3. MECANISMOS DE AÇÃO DAS RIZOBACTÉRIAS

O conhecimento dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para competir, colonizar e permanecer na rizosfera e no rizoplano das raízes, é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma estratégia para alcançar êxito no uso de microrganismos no biocontrole de fitopatógenos de solo. Segundo Blakeman & Fokkema (1982), o conhecimento dos mecanismos de antagonismos dos microrganismos auxilia na

determinação da época, da forma e da quantidade adequada para aplicação dos antagonistas.

Microrganismos competem por espaço, alimento e elementos essenciais que estão disponíveis no solo e na rizosfera (BAKER, 1981). A bacterização de sementes e raízes de plantas, bem como a aplicação no solo de suspensões de microrganismos, tem o propósito de suprimir doenças causadas por fitopatógenos. A interação entre microrganismos e também patógenos pode ocorrer diretamente usando um ou mais mecanismos de antagonismo, tais como: competição, parasitismo e antibiose ou ainda indiretamente, no caso da indução de resistência sistêmica na planta (THOMASHOW et al, 1997). Não se pode esquecer a influência das condições ambientais para a efetiva manutenção e estabelecimento dos agentes de controle biológico, tais como temperatura, umidade, pH e tipo de solo.

1.3.1. Produção de Compostos Inibitórios

Uma grande variedade de microrganismos, principalmente do solo, produz composto inibitório a outros microrganismos, originários do metabolismo secundário, que são derivados dos precursores do metabolismo primário, mas diferem em sua estrutura. Alguns destes compostos são os antibióticos, pigmentos, toxinas, inibidores de enzimas, feromônios e promotores de crescimento de animais e plantas, entre outros (DEMAIN, 1992 citado por ETCHEGARAY, 1998; MELO, 2002). Estes autores ressaltaram também, que o metabolismo secundário não é essencial para o crescimento dos microrganismos que o produzem, mas é uma via alternativa que colabora para sua sobrevivência na natureza.

A produção de antibióticos por rizobactérias é considerada como o principal mecanismo de controle de fitopatógenos do solo. Antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular, que em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de alguns organismos (FRAVEL, 1988; THOMASHOW et al. 1997). Bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Bacillus* e *Pseudomonas* produzem compostos antibióticos que constituem um importante fator na supressão de doenças de raízes (BUCHENAUER, 1998). O papel dos antibióticos é

comprovado quando mutantes defectivos, para a sua síntese, não promovem proteção à planta.

Tabela 1. Relação de Rizobactérias que têm sido utilizadas como agentes de controle (Melo, 1998 modificado).

| Cultura | Rizobactéria | Patógeno | Referências |
|------------------------|---|---|---|
| Algodão | <i>Enterobacter cloaceae</i> e <i>Erwinia herbicola</i> <i>Pseudomonas</i> | <i>Pythium</i> sp. | Nelson, 1988 |
| Algodão | <i>P. fluorescens</i> e <i>P. putida</i> | <i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>Xantomonas axonopodis</i> | Mondal et al. 2000 Mondal et al. 2000 |
| Arroz | <i>Pseudomonas</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | Nandakumar et al. 2001 |
| Batata | <i>P. putida</i> | <i>Erwinia carotovora</i> | Mantovanelo & Melo, 1994 |
| Beterraba e algodão | <i>P. fluorescens</i> | <i>Pythium</i> sp. | Walter & Gindrat, 1988 |
| Cenoura | <i>B. subtilis</i> , <i>Agrobacterium</i> <i>radiobacter</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>A. tumefaciens</i> | Peixoto et al., 1995 |
| Citros | <i>Pseudomonas putida</i> e <i>Bacillus subtilis</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> | <i>Phytophthora parasitica</i> e <i>P. citrophthora</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>P. parasitica</i> <i>P. citrophthora</i> e <i>P.</i> <i>parasitica</i> | Amorim, 1997; Amorim & Melo, 2002 Gardner et al., 1984 Yang et al., 1994 Steddom et al., 2002 |
| Gramíneas | <i>P. fluorescens</i> | <i>Sclerotinia</i> <i>homoeocarpa</i> | Rodriguez & Pfender, 1997 |
| Maçã | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Phytophthora cactorum</i> | Lévesque et al., 1993 |
| Milho | <i>Pseudomonas cepacea</i> <i>Bacillus</i> sp. | <i>F. roseum</i> f.sp. <i>cerealis</i> | Hebbat et al., 1992 Chang & Kommedahl, 1968 |
| Morango | <i>Bacillus mycoides</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | Guetsky et al., 2002 |
| Pepino | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas</i> | <i>F. solani</i> <i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i> <i>P. aphanidermatum</i> | Melo & Valarini, 1995 Chen, et al. 2000; Zhou & Paulitz, 1993 |
| Tomate | <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> | <i>Pseudomonas</i> <i>solanacearum</i> <i>Pythium ultimum</i> | Peixoto et al., 1995 Hultberg et al. 2000 |
| Trigo | <i>P. fluorescens</i> | <i>Gaeumannomyces</i> <i>graminis</i> var. <i>tritici</i> | Cook & Weller, 1987 |
| Trigo | <i>P. fluorescens</i> | <i>Pythium</i> sp. | Weller & Cook, 1983 |
| Tulipa | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Pythium ultimum</i> | Westersteijn, 1990 |

A detecção *in vitro* da síntese de antibióticos pode ser realizada por extratos, culturas filtradas e purificados, quando esses inibem o patógeno, indicando possuírem atividade antimicrobiana originada dos seus metabólitos (FRAVEL 1988). Muitos tipos de antibióticos são produzidos por diferentes populações de bactérias e fungos. Entre os antibióticos de origem bacteriana, os mais citados são: Zwittermicina A, produzido por *Bacillus cereus*; iturina A, produzido por *B. subtilis*; herbicolina A, produzido por *Erwinia herbicola*; fenazina (PHZ), produzida por *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Entre as *Pseudomonas*, vários antibióticos têm sido identificados, tais como: 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pirrolnitrina (PRN), pioluteorina (PLT), entre outros (SOUZA, 2002).

1.3.2. Competição por Nutrientes

Microrganismos competem, uns com os outros, por espaço físico, água, luz e nutrientes, tais como carbono, nitrogênio, fósforo, ferro, entre outros. Entretanto, a competição por ferro é relatada como responsável pela inibição do crescimento ou mesmo a exclusão de patógenos e microrganismos deletérios no solo. Essa competição ocorre nos solos em que o elemento ferro encontra-se em condições limitantes, o que é geralmente observado em solos com pH neutro ou alcalino. Nessas condições, microrganismos e plantas dependem de agentes quelantes para solubilizar e transportar o ferro inorgânico (LUCON, 2000).

Sideróforos são agentes quelantes que possuem uma alta afinidade pelo Fe III, com baixo peso molecular (< 1500 Da) e, seletivamente complexam e transportam Fe para o interior da célula microbiana (NEILAND, 1981; LEONG, 1986, LUCON, 2000)

Grande parte dos trabalhos da literatura refere-se à produção de sideróforos produzidos por *Pseudomonas*, mas a grande maioria dos microrganismos estudados, possui algum sistema de transporte de ferro; inclusive, os produzidos por outros organismos (LUCON, 2000). Marugg et al. (1989) constataram que alguns agentes de biocontrole, altamente ativos, sintetizam apenas um tipo de sideróforo, possuindo entretanto, diferentes receptores na sua membrana.

Muitas populações de microrganismos do solo, bactérias, fungos, actinomicetos, entre outros, têm a capacidade de produzir uma ampla variedade de sideróforos, tais como: aerobactina, artrobactina, ferrioxamina B, ácido rodotorulico, ferricromo, copogena. As bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir sideróforos fluorescentes e não fluorescentes, tais como, ácido salicílico, pioverdina, pseudobactim, ferribactim, fotossideróforos, ferricromo, ferroxamina B e pioquelim. Todavia, os sideróforos fluorescentes são os mais citados como envolvidos no biocontrole, isto devido sua alta afinidade pelo Fe (DOWLING; O’GARA, 1994).

Klopper et al. (1980) demonstraram em experimentos controlados, que a adição de ferro, na forma de etilenodiamina tetracetado de ferro III (Fe EDTA), suprimiu a ação antagonística *in vitro*. Eles observaram ainda que o sideróforo pseudobactim purificado de *P. fluorescens* B-10, apresentou atividade bacteriostática contra *Erwinia carotova*, fato que não ocorreu com o pseudobactim férrica, um sideróforo complexado com ferro.

1.3.3. Parasitismo e Predação

Muitos protozoários, nematóides, artrópodes, vertebrados, fungos, vírus e bactérias têm sido citados como responsáveis pela colonização de estruturas vegetativas e reprodutivas de patógenos. Entre os mais bem caracterizados no biocontrole, utilizando os mecanismos de parasitismo, estão os fungos, principalmente o *Trichoderma* e mais recentemente, as bactérias.

Weindling & Fawcett (1936) foram os pioneiros no uso de linhagens de *Trichoderma* sp. no controle de doenças causadas em citros por *Rhizoctonia solani*. Muitos esforços têm sido realizados na tentativa de isolar linhagens de fungos eficazes no controle de doenças de plantas causadas por outros fungos. Desta forma, o fungo saprófita do gênero *Trichoderma* vem sendo utilizado com sucesso no controle de algumas doenças de plantas causadas por fungos fitopatogênicos, tais como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp., *Fusarium* spp, entre outros (MELO, 1990; 1998)

O micoparasitismo é dito como: “o reflexo de uma hostilidade química (antibiose) e ação canibal (digestão por enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases, glucanases e lipases), resultando na eliminação de um e no aproveitamento dos restos celulares pelo

sobrevivente” (LIMA et al., 2000). Estes autores descrevem os processos envolvidos neste mecanismo de biocontrole. São eles: reconhecimento do alvo pelo antagonista, transmissão de sinais que resultam na interação entre o antagonista e o fitopatógeno, indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista e a digestão da célula alvo. Desta forma, a constituição da parede celular dos fungos, merece destaque, pois é uma estrutura rígida que além de proteger a célula, exerce a função seletiva de fluxo de material, renovando-se durante o crescimento da célula, o que, conforme Lima et al. (2000) influencia o processo de interação antagonista-hospedeiro.

A parede celular dos fungos e oomicetos são estruturas complexas, constituídas de carboidratos, quase todos na forma de polissacarídeos (80 a 90%), tais como β -1,3-glucanas (celulose, β -1,3 e β -1,6-glucanas), quitinas, proteínas, lipídios e íons inorgânicos, além de melanina e caroteno, em alguns casos (LUZ; MATSUOKA, 2001). Desta forma, o arranjo e a composição da parede celular identificam categorias específicas de alguns gêneros de fitopatógenos de importância, tais como, *Phytophthora* e *Pythium* (Oomicetos), cuja parede é constituída, principalmente de celulose e glucana. Já, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Rhizoctonia* e *Sclerotium* (fungos verdadeiros) são formadas, predominantemente, de quitina e glucana. Diante disso, as enzimas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular desempenham um importante papel no processo de antagonismo. Informações mais detalhadas poderão ser obtidas em Lima et al. (2000).

Os fungos são conhecidos por produzirem muitas enzimas, tais como as quitinases, celulasas e proteases capazes de degradar a parede celular de diversos fitopatógenos. Entretanto, entre as bactérias a *Serratia marcescens*, *Arthrobacter* spp e *Enterobacter* spp. estão entre as que produzem enzimas quitinolíticas (HADAR et al., 1979; JONES et al., 1986) com a mesma capacidade dos fungos.

Muitos experimentos têm sido realizados utilizando os genes que codificam enzimas degradadoras. Por exemplo: o gene (*chitA*) codificante da enzima quitinase de *S. marcescens* foi clonado em *Escherichia coli*, e desta forma, a proteína recombinante afetou drasticamente as pontas da hifas de *Sclerotium folfsii*, além de reduzir a incidência da doença causada por este fitopatógeno em feijoeiro e por *Rhizoctonia solani* em algodão (SHAPIRA et al., 1989). Muitos desses experimentos têm como objetivo a obtenção de microrganismos supreprodutores de enzimas, os quais podem ter sua capacidade antagônica

aumentada, além de evitar a utilização de microrganismos que podem ser nocivos a saúde humana.

1.3.4. Indução de resistência sistêmica

Este mecanismo de antagonismo conhecido por indução de resistência sistêmica (IRS) ou indução sistêmica adquirida (SAR) é definido como a ativação das defesas químicas e físicas da planta hospedeira por um agente indutor que pode ser uma substância química ou microrganismo, o que geralmente, leva ao controle de vários patógenos (KLOPPER et al. 1997). O agente indutor poderá ser um ativador químico, extratos de células de microrganismos ou microrganismos vivos. Quando este último está envolvido, quase sempre os indutores são rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e diz-se que o mecanismo é a indução de resistência sistêmica (IRS) mediada por RPCPs. Os sinais biológicos que desencadeiam a IRS têm sido bastante estudados e os mais referidos são sideróforos, ácido salicílico, lipopolissacarídeos, etileno e jasminatos, e entre os mecanismos ativados pelas RPCP na IRS estão as PR-proteínas, o acúmulo de lignina, calose, compostos fenólicos e fitoalexinas (MARIANO; ROMEIRO, 2000). Uma revisão completa sobre IRS mediada por Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas foi realizada por esses pesquisadores.

Raízes de pepino foram tratadas contra a CMV (Vírus do Mosaico do Pepino) (RAUPACH et al., 1996) e antracnose (*Colletotrichum orbiculare*) (WEI et al., 1991), utilizando *Pseudomonas putida* 89B-27 e *Serratia marcescens* 90-166 que induziram resistência sistêmica na planta. Foram isoladas da rizosfera e rizoplano de plantas sadia de tomateiro, rizobactérias que não tinham nenhum efeito, *in vitro*, contra *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Entretanto, quando as sementes sadias foram microbiolizadas por embebição com estas rizobactérias, aparentemente, induziram resistência a *P. syringae* pv *tomato* em plantas originadas dessas sementes (ROMEIRO et al. 1999).

1.4. UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NA CITRICULTURA

A utilização de rizobactérias para a promoção do crescimento e aumento da produtividade, bem como no controle biológico de fitopatógenos de culturas perenes, como citros, tem sido pouco relatado na literatura. Entretanto, tem sido sugerida a sua possível aplicabilidade, principalmente na produção de mudas e no favorecimento de populações no manejo do pomar (BALOTA; KANASHIRO 1998).

Com o propósito de selecionar microrganismos antagônicos a *Phytophthora parasitica* em citros, Amorim (1997) testou os efeitos de bactérias, fungos e compostos orgânicos, isoladamente ou em associação. Os isolados de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Trichoderma* apresentaram ação variada *in vitro*, mas *in vivo* houve um controle do patógeno tanto na incorporação do antagonista isoladamente, como em mistura. Alguns isolados bacterianos também estimularam o crescimento da plântula. Outro trabalho observou as interações entre *P. parasitica*, agentes de controle biológico e micorrizas, utilizando diferentes substratos em *Citrus limonia* (AGNANI, 2002). Neste trabalho o fungo *Trichoderma* diminuiu a colonização micorrízica, mas controlou o patógeno, isoladamente ou em associação com os outros tratamentos. Este autor concluiu que as plantas micorrizadas controlaram o patógeno e apresentou maior crescimento em todos os substratos testados. Em outros trabalhos observa-se que a associação de isolados de rizobactérias e *Trichoderma* foi mais eficiente em controlar *P. parasitica* e *P. citrophthora* em citros do que a utilização de rizobactérias isoladamente (AMORIM; MELO, 1999).

Turney & Menge (1993) isolaram um contaminante de *P. citrophthora*, a bactéria *Pseudomonas putida* 06909, que efetivamente reduziu a população, tanto de *P. parasitica* como *P. citrophthora*, agentes causais da podridão de raízes de citros, em casa de vegetação e em câmara de germinação. Outros trabalhos também relatam o controle de *P. parasitica* por bactérias na podridão de raízes em citros (GARDENER et al., 1984; STEDDOM et al. 2002).

1.5. IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Phytophthora* NA CITRICULTURA

O primeiro relato do reconhecimento de *Phytophthora* como patógeno, ocorreu em 1876 por Anton de Bary. Nessa época a doença causada por *P. infestans* devastou as plantações de batata na Irlanda. A partir daí, novas espécies foram descritas. Atualmente, mais de oitenta espécies diferentes estão descritas na literatura (ERWIN; RIBEIRO, 1996; HO; LU, 1997). Estas, na sua maioria, são patógenos de culturas economicamente importantes no Brasil e no mundo.

A moderna classificação do gênero *Phytophthora* é o Reino: Stramenopila; Filo: Oomycota; Classe: Oomycetes; Ordem: Pythiales; Família: Pythiaceae (ALEXOPOULOS et al., 1996 e LUZ; MATSUOKA, 2001).

Os oomicetos têm muitas características comuns aos vegetais, tais como celulose em suas paredes, cuja análise sequencial do DNA demonstrou que eles são mais semelhantes às algas diatomáceas e marrons pertencentes a um reino denominado Stramenopila (DEACON, 1997). Entretanto, possui características biológicas, físicas e morfológicas similares ao Eumycota (fungos verdadeiros), o que lhe permite continuar sendo chamado de “fungo” (LUZ; MATSUOKA, 2001).

A gomose e a podridão do pé e das raízes constituem uma das principais doenças dos citros no Brasil, causando prejuízos em viveiros e pomares. As principais espécies conhecidas no Brasil são: *P. parasitica* (sin= *P. nicotianae*) e *P. citrophthora* (FEICHTENBERGER et al., 1997).

No Brasil, a incidência da gomose do citros aumentou após o aparecimento da tristeza e do declínio dos citros, pois a maioria da porta-enxertos empregados é suscetível a *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 1989; 1990). As medidas preventivas nos viveiros para obtenção de mudas sadias são extremamente importantes para evitar a disseminação da doença para áreas não infestadas. Entretanto, o patógeno está amplamente disseminado nas áreas citricolas brasileiras. A proteção das mudas com rizobactérias previamente selecionadas para o controle de *Phytophthora* e a promoção do crescimento de plantas cítricas, será uma medida da “produção integrada dos citros”, levando a uma melhora da qualidade de vida do citricultor e consumidor, pela menor necessidade de pulverizações e menor agressão ao meio ambiente.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNANI, D.R.G. **Interação de fungos micorrízicos arbusculares, agentes de controle biológico e *Phytophthora parasitica* em limoeiro cravo (*Citrus limonia*)**. Piracicaba, São Paulo, 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 71p.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 4ª edição, 1996. 869 p.

AMORIM, E.P.R. **Controle Biológico de *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em Plântulas de Citros**. Batucatu, São Paulo, 1997. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista Campus Botucatu. 111p.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.4, 1999.

ATLAS, R.M. Applicability of general ecological principles to microbial ecology. In: POINDEXTER, J.S. LEADBETTER, E.R. **Bacteria in Nature**. Plenum Press, New York, p.339-361, 1986.

BAKER, R. Biological control: eradication of plant pathogens by adding organic amendments to soil. In: Pimental, D. **Handbook of Pest Management in Agriculture**, Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida, v.2. p. 137-157. 1981.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C.P. ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone level of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.793-800, 2001.

BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-192, 1982.

- BALOTA, E.L.; KANASHIRO, M. A microbiologia do solo na cultura de citros. In: **Revista Laranja**, Revista técnico científico de citricultura, Cordeirópolis, v.19, n.1, p.167-183, 1998.
- BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Ecology of *Arthrobacter* JG9 detectable hydroxamate siderophores in soil, **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.487-492, 1986.
- BRIAN, P.W. The ecological significance of antibiotic production. In: WILLIAMS, R.E.O.; SPICER, C.C. **Microbial Ecology**, p.168-188, 1957.
- BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.35, p.443-445, 1972
- BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococum*. **Journal General Microbiology**, v.53, p.135-144, 1968.
- BRUEHL, G.W. The rizosphere. IN: BRUEHL, G.W. **Soilborne Plant Pathogenes**, p.105-113, 1987.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.104, n.4, p.329-348, 1998.
- BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v.68, n.9, p.1377-1383, 1978.
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v.44, p.139-144, 1998.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p.13-23, 2000.
- DEACON, J.W. **Modern mycology**. Edinburgh, Blackwell Science. 303p, 1997.
- DICK, M.W. The Straminipilous Fungi: A new classification for the biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to Lagenidaceous fungi. C.A.B. Interact. **Mycology Papers**, n.168, 1995.

DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Metabólites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Tibtech**, v.12, p.133-141, 1994.

ELLIOT, E.T.; COLEMAN, D.C.; INGHAM, R.E.; TROYFMOW, J.A. Carbon and energy flow through microplora and microfauna in the soil subsystem of terrestrial ecosystems. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current Perspectives in Microbial Ecology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.424-433, 1984.

ENEBACK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v.44, p.139-144, 1998.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul:APS Press, 1996. 562p.

ETCHEGARAY, A. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. In: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**, Embrapa-Jaguariúna-SP, 1998, cap. 16, p.393-419.

FEICHTENBERGER, E. Control of *Phytophthora gummosis* of citrus with systemic fungicides in Brazil. **Bulletin OEPP**, v.20, p.139-148, 1990.

FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**, v.10, n.2, p.359-378, 1989.

FEICHTENBERGER, E. **Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros**. São Paulo: Rodhia Agro, 1996, 42p.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agonomica Ceres, 1997, v.2, p. 261-296.

FERRIN, D.M.; KABASHIMA, J.N. *In vitro* insensitivity to metalaxyl of isolate os *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental host in southern California. **Plant Disease**, v.75, p.1041-1044, 1991.

FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.75-91, 1988.

GARDNER, J.M.; CHANDLER, J.L.; FELDMAN A.W. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonas on citrus roots. **Plant and Soil**, v.77, p.103-113, 1984.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, 78p, 2000.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression, **Phytopathology**, v.92, n.9, p.976-985, 2002.

HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.69, p.64-68, 1979.

HAGEDORN, C. GOULD, W.D.; BARDINELLI, T.R. Rhizobacteria of Cotton and their Repression of Seedling Disease Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.11, p.2793-2707, 1989.

HANDELSMAN, J.; RAFFEL, S.J.; MESTER, E.H.; WUNDERLICH, L. GRAU, C.R. Biological control of damping-off alfafa seedling with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.3, p.713-718, 1990.

HO, H.H.; LU, J.Y.A. A synopsis of the occurrence and pathogenicity of *Phytophthora* species in mainland China. **Mycopathologia**, v.138, p.143-161, 1997.

HÖFTE, M.; BOELEN, J.; JURKEVITCH, E.; VERSTRAETE, W. Pyoverdine production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANPIS. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, n.5, p.407-410, 1991.

HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluteorin. **Phytopathology**, v.70, n.8, p.712-715, 1980.

HULTBERG, M.; ALSANIUS, B. SUNDIN, P. *In vivo* and *in vitro* interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the suppression of damping-off in tomato seedlings, **Biological Control**, v.19, p.1-8, 2000.

JONES, D.G.; GRADY, K.L.; SUSLOW, T.V.; BEDBROOK, J.R. Isolation and characterization of gene encoding two chitinase enzyme from *Serratia marcescens*. **EMBO Journal**, v.5, p.467-473, 1986.

JUAREZ-PALACIOS, C.; FELIX-GASTELUM, R.; WAKEMAN, R.J.; PAPLOMATAS, E.J.; DeVAY, J.E. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. **Plant Disease**, v.75, n.11, p.1160-1164, 1986.

KAPULNIK, Y. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. In: WAISEL, Y; ESHEL A.; KAFKAFI, U. **Plant and Roots : the hidden half**, cap. 32, p.717-729, 1991.

KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pest. **Annual Review of Phytopathology**, v.19, p.211-236, 1981.

KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, n.5, p.450-454, 1980.

KATZNELSON, H. Nature and importance of the rhizosphere. In: BAKER, K.F.; SNYDER, W.C. **Ecology of Soil Borne Plant Pathogens – Prelude to Biological Control**. University of California Press, Berkeley, p.187-209. 1965.

KATZNELSON, H.; COLEM, S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal of Microbiological**, v.11, p.733-741, 1965.

KAVIMANDAN, S.K.; GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. on phosphate uptake and yield of maize. **Current Science**, v.40, p.439-440, 1971.

KLOEPPER, J.W.; HUME, D.J.; SCHER, F.M.; SINGLETON, C.; TIPPING, B.; LALIBERTÉ, M.; FRAULEY, K.; KUTCHAW, T.; SIMONSON, C.; LIFSHITZ, R.; ZSLESKA, I. and LEE, L. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). **Plant Disease**, 72, p.42-46. 1988.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie (ed), **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, I.N.R. A., Route de Saint-Clément Beaucouzé, Angers. Gilbert-Clarey, Tours, v. II, p.879-882, 1978.

KLOPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v.71, p.642-644, 1981.

KLOPPER, J.W.; LEONG, J. TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v.286, p.885-886, 1980.

KLOPPER, J.W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G.W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance – historical precedence. **Phytopathology**, v.87, p.136-137, 1997.

KLUEPFEL, D.A. The behavior and tracking of bacteria in the rizosfera. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.441-472, 1993.

LEONG, J. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986

LIFSHITZ, R. KLOPPER, J.W.; KOZLOWSKIM, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TRIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.

LIMA, L.H.C.; De MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas Hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, v.2, cap.8, p.263-304, 2000

LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995.

LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**, Jaguariúna – Embrapa Meio Ambiente, v.3, cap.6, p.141-161, 2000

LUZ N, E.D.M. *Phytophthora*: fungo, protista ou cromista? In: LUZ, N.E.D.M.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Livraria e editora Rural, cap. 1, p.1-21, 2001.

LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou cromista? In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças Causadas por *Phytophthora*** no Brasil, 2001, cap.1, p.1-21.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. IN: Ed. FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v 4, p.1-49, 1996.

LYNCH, J.M. Introduction: some consequences on microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: LYNCH, J.M. John Wiley & Sons Ltd. **The Rhizosphere**, p.1-10, 1990.

MARGULIS, L. Introduction. In: MARGULIS, L.; CORLISS, J.O.; MELKONIAM, M.; CHAPMAN, D.J. **Handbook of protozoa**. Jones & Barlett, Boston, 1990. P.xi-xxiii.

MARIANO, R.L.R.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**, v.2, p. 305-324, 2000.

MARUGG, J.D.; DE WEGER, L.A.; NEILANDER, H.B.; OORTHUIZEN, N.; RE COURT, K.; WEISBEEK, P.J. Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore-mediated Fe^{3+} assimilation in *Pseudomonas putida* WCS358. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.1812-1819, 1989.

MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Effect of sodium tetrathiocarbonate, metalaxyl, and fosetyl-Al on development and control of *Phytophthora* root rot of citrus. **Plant Disease**, v.75, n.3, p.264-268, 1991.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**, Embrapa-Jaguariúna-SP, 1998, cap. 3, p.87-116.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap. 1, p.1-48, 2002.

MELO, I.S.; LUCON, C.M.M. Efeito de rizobactéria na germinação de sementes e no crescimento de plantas de milho, em baixa temperatura. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.350 (suplemento), 1995.

- MISHUSTIN, E.N.; NAUMOVA, A.N. Bacterial fertilizer, their effectiveness and mode of action. **Mikrobiologiya**, 31, p.543-555, 1962.
- MONDAL, K.K.; SINGH, R.P.; DUREJA, P.; VERMA, J.P. Secondary metabolites of cotton rhizobacteria in the suppression of bacterial blight of cotton, **Indian Phytopathology**, v.53, n.1, p.22-27, 2000.
- MONTAVANELO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.20, p.123-126, 1994.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; SHEELA, J.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. **Biocontrol**, v.46, p.493-510, 2001.
- PATTERSON, D.J.; SOGIN, M.L. Eukaryote origins and protistan diversity. In: HARTMAN, H.; MATSUNO, K. **The origin and evolution of prokaryotic and eukaryotic cell**, Wold Science, Singapore, p.14-46; 1992.
- PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; OLIVEIRA, S.M.A. Colonização, sobrevivência e mecanismos de ação de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, agente potencial para o biocontrole de *Pseudomonas solanacearum*, em tomate. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.213-218, 1995.
- RAUPACH, G.S.; LIU, L.; MURPHY, J.F.; TUZUM, S.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria PGPRs. **Plant Disease**, v.80, p.891-894, 1996.
- ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: Ed. BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**, Embrapa/CNPMA, p121-133, 1991.
- RODRIGUEZ, F.; PFENDER, W.F. Antibiosis and Antagonism of *Sclerotinia homeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and in planta. **Phytopathology**, v.87, n.6, p.614-621, 1997.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.339-358, 1987.

SCHROTH, M.N.; BECKER, J.O. Concepts of Ecological and Physiological Activities of Rhizobacteria Related to Biological Control and Plant Growth Promotion. In: . HORNBY, D. **Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens**, p. 389-414, 1990.

SHAPIRA, R.; ORDENTLICH, A.; CHET, I.; OPPENHEIM, A.B. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. **Phytopathology**, v.79, p.1246-1249, 1989.

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Colonization and growth promotion of outpanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. **Canadian Journal of Forest Research**, v.30, n.6, p.845-854. 2000.

SIMINOFF, P.; GOTTLIEB, D. The production and role of antibiotics in the soil. I. The fate of streptomycin. **Phytopathology**, v.41, p.420-430, 1951.

SINIGAGLIA, C.; PATRÍCIO, F.R.A.; GHINI, R.; MALAVOLTA, J.; TESSARIOLI, J.; FREITAS, S.S. Controle de *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani* e plantas daninha em alface pela solarização do solo e sua interação com controle químico. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.2, p.229-235, 2001.

SOUZA, J.T. **Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp.** Thesis (Doctor) Wageningen University, The Netherlands, 157p., 2002.

STEDDOM, K.; MENGE, J.A.; CROWLEY, D.; BORNEMAN, J. Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* 06090-rif/nal on citrus soil microbial communities. **Phytopathology**, v.92, n.8, 2002.

SUSLOW, T.V.; KLOPPER, J.W., SCHROTH, M.N. and BURR, T.J. Beneficial bacteria enhance plant growth. **California Agriculture**, n. 33, p.15-17, 1979.

SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Rhizobacteria of sugarbeets: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v.72, p.199-206, 1982.

THOMASHOW, L.S.; BONSALE, R.F.; WELLER, D.M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M.V. **Manual of Environmental Microbiology**, ASM Press, Washington, D.C., USA, p.493-499, 1997.

TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora parasitica*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. **Plant Disease**, v.82, p.254-261, 1998.

TURNEY, J.K.; MENGE, J.A. Biocontrol of *Phytophthora citrophthora* root rot of citrus. (abstract) **Phytopathology**, v.83, p.1348, 1993.

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A.; MENZIES, J.G. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.21, p.265-271, 1999.

VANCURA, V. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plant and their relation to root exudates. **Folia Microbiologica**, v.25, p.168-173, 1980.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.81, p.1508-1512, 1991.

WEINDLING, R.A.; FAWCETT, W.S. Experiment in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedling. **Hilgardia**, v.10, p.1-6, 1936.

WELLER, D.M.; COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v. 73, n.3, p.463-469, 1983.

YANG, C.H.; MENGE, J.A.; COOKSEY, D.A. Mutations affecting hyphal colonization and pyoverdine production in pseudomonads antagonistic toward *Phytophthora parasitica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.2, p.473-481, 1994.

ZHOU, T.; PAULITZ, T.C. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots, **Phytopathology**, v.83, n.8, p.872-876, 1993.

POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE RIZOBACTÉRIA A
Phytophthora parasitica

POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE RIZOBACTÉRIA À *Phytophthora parasitica*

RESUMO

Para os testes de antagonismo, quinze rizobactérias foram confrontadas com *Phytophthora parasitica* nos meios BDA, KB e CA. A *Escherichia coli* foi utilizada como controle negativo. Paralelamente a este teste, uma gota de metalaxil foi aplicada sobre o meio de cultura, a 6 cm de distância do disco com micélio do patógeno, em três diferentes concentrações (250, 1000 e 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para ter um referencial estável uma curva padrão foi construída em função do halo de inibição. Em todos os tratamentos foram utilizadas duas concentrações de ágar (1,5 e 2%) e três repetições. No meio BDA os isolados de *Paenibacillus polymyxa* (Pap2), *Pseudomonas fluorescens* (Psf2), *Serratia marcescens* (Sem), e *Bacillus subtilis* (Bas) se destacaram com percentuais inibitórios de 52, 38, 37, 28 e 20%, cujas concentrações médias equivalentes foram: 976, 168, 147 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já no meio KB, *P. polymyxa* (Pap2 e Pap1), *P. putida* (Psp1) e *Serratia marcescens* (Sem) causaram inibições com concentrações médias equivalentes de: 2187, 154, 106 e 107 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já o isolado de *S. marcescens* parasitou o micélio do patógeno. No meio CA, *P. polymyxa* (Pap2) comportou-se como o melhor antagonista inibindo 43,16% o crescimento micelial. Este controlou o patógeno nos três meios testados, tendo um caráter constitutivo com baixa influência nutricional.

Palavras-chave: biocontrole, *in vitro*, antagonismo.

INHIBITION POTENTIAL OF RHIZOBACTERIA AGAINST *Phytophthora parasitica*

ABSTRACT

Fifteen rhizobacteria species were evaluated against *Phytophthora parasitica* in antagonism tests utilizing PDA, KB and CA as media. *Escherichia coli* was utilized as a negative control. Concurrently with this test, one drop of metalaxyl was applied to the culture medium, 6 cm from the disc containing the pathogen's mycelium, at three different concentrations (250, 1,000 and 10,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In order to obtain a steady reference, a standard curve was constructed based on the size of the inhibition halo. Two agar concentrations (1.5 and 2%) and three replicates were utilized in all treatments. The *Paenibacillus polymyxa* (Pap2), *Pseudomonas fluorescens* (Psf2), *Serratia marcescens* (Sem), and *Bacillus subtilis* (Bas) isolates showed the best results in the PDA medium, with inhibition percentages of 52, 38, 37, 28 and 20%, at mean equivalent concentrations of 976, 168, 147 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In the KB medium, *P. polymyxa* (Pap2 and Pap1), *P. putida* (Psp1) and *Serratia marcescens* (Sem) caused inhibitions with mean equivalent concentrations of 2187, 154, 106 and 107 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In this medium, only the Pap1 isolate of *P. polymyxa* inhibited mycelial growth in *P. parasitica*. The *S. marcescens* isolate, on the other hand, was able to parasitize the pathogen's mycelium. *P. polymyxa* (Pap2) behaved as the best antagonist in the CA medium, inhibiting mycelial growth by 43.16%. This rhizobacterium controlled the pathogen in the three media tested, and its constitutive traits were under little nutritional and environmental influence.

Keywords: biocontrol, *in vitro*, antagonism.

2.1. INTRODUÇÃO

O controle biológico é um método alternativo bastante atrativo no combate à doenças de plantas, porque os compostos químicos tem perda de eficiência e dos problemas ambientais causados pelos resíduos destes produtos.

A confirmação da eficiência dos agentes do controle biológica de doenças de plantas é realizada pelos testes de antagonismos em campo que são trabalhosos e necessitam de grande espaço para serem realizados; em função disso, a seleção de microrganismos pela inibição do patógeno *in vitro* é um método de seleção rápido e barato. Entretanto, alguns autores criticam este método pela falta de correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, portanto insatisfatório como processo de seleção (RHODES et al, 1987; SUSLOW; SCHROTH, 1982). Apesar das inúmeras desvantagens, o isolamento e a seleção de bactérias benéficas ao sistema radicular são feitas através de testes *in vitro*, devido, principalmente, ao grande número inicial de microrganismos a serem testados, onde poucos serão selecionados para os testes *in vivo*.

Os testes *in vitro* possuem um amplo uso na quantificação de inibição do patógeno pela formação de halos em placas. Entretanto há muitas variáveis que, normalmente, não são levadas em consideração, as quais tem efeitos sobre os resultados. Como exemplos encontram-se o tempo de difusão do composto e a densidade do ágar utilizado (CABO et al., 1999).

Os testes *in vitro* têm capacidade de detectar os principais mecanismos de ação usados por rizobactérias para promover o controle biológico de fitopatógenos de solo, são: antibiose, competição por nutrientes e parasitismo (MARIANO, 1993). O antagonismo é normalmente observado através da técnica de ágar em placas, cuja avaliação pode ser qualitativa e quantitativa. No caso desta técnica a avaliação é feita mensurando-se o halo de inibição entre as colônias, que varia de acordo com a eficiência do metabólito produzido.

A produção de antibióticos por microrganismos é considerado o principal mecanismo de controle de fitopatógenos. Os antibióticos bacterianos mais conhecidos são: Zwittermicina A, produzido por *Bacillus cereus*, iturina A, produzido por *B. subtilis*, herbicolina A, produzidos por *Erwinia herbicola*, fenazina (PHZ), produzida por *Pseudomonas* e *Streptomyces*. O gênero *Pseudomonas* produz uma grande quantidade de

antibióticos, quando se compara com outros gêneros, tais como 2-4-diacetilfloroglucinol (2-4-DAPG), pirrolnitrina (PRN), pioluteorina (PLT), entre outros (SOUZA, 2002).

O parasitismo é um mecanismo de ação cujo antagonista e o patógeno interage fisicamente. Desta forma pode-se observar alterações, tais como: perfuração de hifas, destruição de paredes celulares, encurtamento e engrossamento de células, vacuolação, entre outros (MARIANO, 1993).

Já a competição por nutrientes é monitorada quando o microrganismo é cultivado na ausência e na presença de um determinado nutriente ou elemento disputado. As *Pseudomonas* são as mais estudadas pela sua capacidade em produzir sideróforos capazes de quelar o ferro do meio deixando-o indisponível para o fitopatógeno (LUCON, 2000).

A capacidade de controlar fitopatógenos por bactérias possui bastante espaço na literatura. Hultberg et al. (2000) testaram linhagens de *Pseudomonas* no controle de *Pythium ultimum* e constataram a inibição do crescimento micelial devido a produção de metabólitos antimicrobianos em um meio rico em nutrientes e a produção de sideróforos em KB. As *Pseudomonas* são as espécies mais estudadas, pois são capazes de produzir uma ampla variedade de antibióticos e sideróforos. Já os *Bacillus*, tem recebido menos atenção, mas são de interesse, principalmente pela sua capacidade de formar endosporo. Esta estrutura confere resistência às condições ambientais adversas (OSBURN et al. 1995), característica que facilitará sua formulação.

Burr et al. (1978) sugerem que a seleção de isolados bacterianos eficientes pode ser facilitada procedendo-se o isolamento na mesma condição ambiental no qual serão utilizados, quando se confirmar sua capacidade como agente de biocontrole. Ambientes da rizosfera e/ou solos supressivos são os lugares mais adequados para se encontrar bactérias competentes na colonização de raízes, e potenciais agentes de controle biológico (SCHROTH; HANCOCK, 1981).

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi testar a capacidade de bactérias isoladas da rizosfera, principalmente de citros, em inibir o crescimento do patógeno *Phytophthora parasitica*, *in vitro*, em diferentes meios nutricionais e o possível mecanismo de biocontrole. Foi proposto também, a utilização de um referencial químico estável (metalaxil), paralelamente aos testes de antagonismo.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Isolamento e seleção de antagonista

O isolamento das bactérias do solo foi feito mediante diluição seriada e plaqueamento em meios seletivos de amostras de solo coletadas de solo supressivo à *Phytophthora*. Foram preparadas diluições com 10 g de solo rizosférico de citros, e adicionados 90 mL de água destilada esterilizada, agitada por 15 minutos, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir, 1 mL dessa solução foi adicionada a 9 mL de água destilada para obter uma diluição 10^{-2} , e o processo foi repetido até as diluições 10^{-5} e 10^{-6} . Para o isolamento dos microrganismos, 100 μ L das três últimas diluições foram transferidos para meio de cultura e homogeneizado com auxílio de alça de Drigalsky previamente desinfestada em álcool 95° e flambada. Para o isolamento das bactérias foram empregados os meios de cultura Nutriente ágar (NA)(NA Oxoid, 28 g L⁻¹) e King B (KB) (Proteose-peptona 03 Difco, K₂HPO₄, MgSo₄.7H₂O, glicerol, pH 7,2) (KING et al., 1954). Foram feitas três repetições para cada meio – diluição, e mantidas a 25° C até o crescimento das colônias.

Para a seleção de antagonistas, as placas com as colônias bacterianas foram pulverizadas com os esporos do patógeno e observadas, após alguns dias, a formação de halos de inibição. Essas colônias foram repicadas no meio NA e KB e após o crescimento foram transferidas para vidros de penicilina com meio de cultura inclinado, e devidamente preservadas na coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente.

2.2.2. Microrganismos

Foram testados quinze isolados (TABELA 1) selecionados da rizosfera de citros, uma do rizoplano de feijoeiro (OG) e uma de cenoura (Santa Bárbara) e três de citros pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, contra *Phytophthora parasitica* IAC 01/95 do Centro APTACSM. Foi incluído *Escherichia coli* como controle negativo. O patógeno foi preservado em frasco com água destilada esterilizada contendo 3 discos (5mm) com crescimento micelial.

As bactérias foram confrontadas com o patógeno nos meios de cultura batata-dextrose (BDA), KB e cenoura-ágar (CA) (AGUILAR-VILDOSO, 1997), em duas

concentrações de ágar (1,0 e 2%) e três concentrações de metalaxil (250, 1000 e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2.3. Teste de Patogenicidade

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar o potencial do isolado de *P. parasitica* em causar doença em frutos de citros. Micélios do patógeno, crescidos em meio CA, com 7 dias de idade foram inoculados em frutos de limão cravo. Inicialmente, os frutos foram lavados com hipoclorito de sódio 2% e uma solução de benomil (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, com uma agulha esterilizada, micélios do patógeno foram inoculados nos furos feitos nos frutos e cobertos com esparadrapo. Estes foram incubados em câmara úmidos por um período de 7 a 10 dias. A presença de coloração e odor característico da podridão-parda de frutos (FEICHTENBERGER, 2001) confirmou a eficiência do patógeno em causar a doença. Gomos contaminados foram colocados em meio CA com benomil (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rifampicina (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o reisolamento do patógeno. Este teste foi realizado anualmente para confirmar a patogenicidade do isolado IAC-01/95, durante o período experimental.

Tabela 1. Isolados bacterianos testados, sua identificação e o hospedeiro

| CÓDIGO ¹ | ESPÉCIES | ISOLADOS | HOSPEDEIRO |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------|
| Bas | <i>Bacillus subtilis</i> | OG* | Feijão |
| Psp1 | <i>Pseudomonas. putida</i> | Sta. Bárbara* | Cenoura |
| Psp2 | <i>P. putida</i> | C1-1B* | Citros |
| Psp3 | <i>P. putida</i> | 1-4 | Citros |
| Psf1 | <i>P. fluorescens</i> | C ₁ -S/Na* | Citros |
| Psf2 | <i>P. fluorescens</i> | C ₂ -8C* | Citros |
| Psf3 | <i>P. fluorescens</i> | 6-5 ₂ | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 3-6 | Citros |
| Psf5 | <i>P. fluorescens</i> | 2-3 _{1A} | Citros |
| Pss | <i>P. . syringae</i> | 2-6 | Citros |
| Pap1 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 6-5 ₁ | Citros |
| Pap2 | <i>P. polymyxa</i> | 3-4 | Citros |
| Fli | <i>Flavobacterium indologenes</i> | 6-5 ₃ | Citros |
| Sem | <i>Serratia marcescens</i> | R3-5 | Citros |
| Chry | <i>Chryseobacterium sp</i> | 2-3 _{1L} | Citros |
| Esc | <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | Comercial |

* pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

1. Código de identificação

2.2.4. TESTES PRELIMINARES

Para determinar um referencial químico estável, otimizou-se a aplicação pontual do metalaxil no meio de cultura. Avaliou-se: o volume da gota do metalaxil, a melhor formulação do metalaxil e a melhor concentração do ágar que facilitará a difusão do composto no meio.

2.2.4.1. Determinação do Volume

Para se determinar o volume da gota do metalaxil a ser aplicado nos testes de antagonismo, foram testadas a aplicação de gotas variando de 1 a 10 μ L de uma solução de 10.000 μ g mL⁻¹ de metalaxil, em placas de Petri contendo o meio cenoura-ágar. As condições locais na câmara de fluxo foram: temperatura média de 21,4°C com 44% de umidade. O escorrimento foi determinado pelo volume aplicado antes de ser absorvido homogeneamente pelo meio. Mediu-se o diâmetro do espalhamento homogêneo da gota no meio de cultura e o tempo para que ocorresse a sua absorção total.

2.2.4.2. Formulações do metalaxil

Foram avaliados as formulações pó molhável (Apron) e granulado (Ridomil) do ingrediente ativo metalaxil, os quais foram diluídos para 10.000, 1.000, 100, 10 e 1 μ g mL⁻¹, e aplicadas, através de uma gota (5 μ L), em placas de Petri contendo meio CA. Estas gotas, com as diferentes diluições de metalaxil, foram confrontadas com um disco (5 mm) com crescimento do micélio de *Phytophthora parasitica* de um lado, e do outro, distante 6cm, 5 μ L da diluição do metalaxil granulado ou pó molhável. O controle consistiu do patógeno sem a aplicação do metalaxil. As placas foram marcadas na sua parte inferior para minimizar variações na distância entre os antagonistas. Determinou-se diariamente o crescimento radial do micélio. Os critérios de avaliação foram: as formulações comerciais quanto a melhor solubilidade e difusão no meio; a concentração de ágar que facilitou a difusão do ingrediente ativo e a menor concentração de metalaxil que efetivamente inibiu o patógeno. Os fatores em estudo foram concentração do metalaxil e do ágar e tipo de formulação em um arranjo fatorial 6x2x2.

2.2.4.3. Concentração do ágar

Avaliaram-se diferentes concentrações do ágar (1; 1,25; 1,50; 2,0; 2,5 e 3,0%) nas mesmas condições do teste anterior, para obter a melhor difusão do metalaxil em diferentes densidades do meio de cultura. Foram realizadas três repetições

2.2.5. TESTE DE ANTAGONISMO

2.2.5.1. Cultura pareada

Para o ensaio de antagonismo foram confrontadas, em placas de Petri, nos meios King B (KB), batata-dextrose-ágar (BDA) e cenoura ágar (CA), nas concentrações de ágar 1,0 e 2%, um disco de 5 mm com micélio de *Phytophthora parasitica* em um dos lados, e do outro, distante 6 cm, foi feita uma estria da bactéria ou solução de 5µL de metalaxil pó molhável. As placas foram marcadas na sua parte inferior para minimizar variações na distância entre os antagonistas. Os tratamentos foram incubados em escuro contínuo por 13 dias a 25°C. As concentrações do metalaxil utilizadas foram: 250, 1000 e 10.000 µg mL⁻¹, apenas nos meios KB e BDA. A leitura do crescimento radial do micélio do patógeno foi realizada diariamente. O delineamento foi um arranjo fatorial (17+3)x2, [(16 bactérias + 3 concentrações metalaxilx + controle) x 2 concentrações de ágar] inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.5.2. Quantificação da inibição

O potencial de inibição em µg mL⁻¹, das rizobactérias contra *P. parasitica*, foi determinado mensurando-se os halos de inibição nas concentrações de metalaxil (5µL de 250, 1.000 e 10.000µg mL⁻¹) aplicadas nos meio KB e BDA. Com estes valores foram construídas curvas de regressão. A medida do halo de inibição do patógeno pelas rizobactérias foi plotado contra o logaritmo da concentração do metalaxil aplicada nesta curva, produzindo desta forma, o equivalente em µg mL⁻¹ do halo formado pela inibição.

2.2.5.3. Porcentagem de inibição micelial

A porcentagem de inibição relativa do crescimento radial de *Phytophthora parasitica* por diferentes rizobactérias foi obtida conforme a equação abaixo:

$$\text{IR (\%)} = \frac{\text{RC} - \text{RX}}{\text{RC}} \times 100$$

IR= inibição relativa; RC: raio da colônia de *P. parasitica* no controle; RX: raio da colônia pareada com a rizobactéria.

Os dados originais do crescimento micelial de *P. parasitica* foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey (5%).

2.2.5.4. Parasitismo

Foram confrontados em meio KB e BDA, utilizando o método de cultura pareada, os isolados bacterianos e *P. parasitica*. Ao final do período de incubação, foi retirada uma amostra do meio onde ocorreu a interação entre o patógeno e o antagonista. Esta amostra foi colocada sobre uma lâmina e observada em microscópio óptico utilizando lente de imersão. A viabilidade de *P. parasitica* foi avaliada em meio CA com ampicilina (50 µg mL⁻¹) e rifampicina (30 µg mL⁻¹), cujo disco com micélio, retirado da placa dos testes de antagonismo, foi colocado sobre este novo meio e o crescimento micelial foi avaliado por um período de 17 dias.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. TESTES PRELIMINARES

2.3.1.1. Determinação do volume da gota

Para a escolha do volume da gota do fungicida a ser aplicado nos testes, os resultados do diâmetro, tempo de absorção e escorrimento da gota da solução de metalaxyl ($10.000 \mu\text{g ml}^{-1}$), em meio cenoura-agar (CA), podem ser observados na Tabela 2. O diâmetro variou de 3 mm a 11 mm, na aplicação de 1 μL e 10 μL , respectivamente. Já para o volume de 5 μL , o diâmetro médio da gota foi de 7 mm, enquanto que no volume anterior foi de 6 mm, e o posterior, de 8 mm. Ocorreu escorrimento da gota no meio a partir de 7 μL . Já, o tempo de secagem da gota no meio, variou com o volume aplicado, de 1 a 10 minutos. A escolha do volume de 5 μL deveu-se ao tempo de absorção no meio ter sido relativamente rápido (4,41 minutos), sem ocorrer escorrimento da gota na sua aplicação. Esse volume forneceu também, uma margem de segurança entre os volumes vizinhos para que não ocorra escorrimento.

Tabela 2. Determinação do diâmetro, tempo de absorção e escorrimento da gota da solução de metalaxyl ($10.000 \mu\text{g/mL}$), em meio cenoura-agar (CA).

| Quantidade aplicada (μL) | Diâmetro (mm) | Tempo de absorção (minutos) | Escorrimento |
|--|------------------|--------------------------------|--------------|
| 1 | 3,3 | 1,13 | Não |
| 2 | 5,0 | 2,40 | Não |
| 3 | 6,0 | 4,06 | Não |
| 4 | 6,7 | 4,15 | Não |
| 5 | 7,7 | 4,41 | Não |
| 6 | 8,3 | 6,26 | Não |
| 7 | 9,3 | 7,21 | Sim |
| 8 | 9,3 | 7,44 | Sim |
| 9 | 9,7 | 8,59 | Sim |
| 10 | 11,0 | 10,35 | Sim |

2.3.1.2. Formulações

Não houve inibição do crescimento micelial nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas duas formulações testadas. A partir de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve inibição do crescimento do patógeno apenas na formulação pó molhável (TABELA 3). A formulação pó molhável foi mais eficiente em inibir o crescimento do micélio de *P. parasitica* do que o granulado, com halos de 2,2 cm contra 0,1 cm para 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3,6 e 2,0 para 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

O patógeno foi inibido significativamente quando a formulação pó molhável foi aplicada na concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil, enquanto que, o granulado, somente a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Assim sendo, a formulação pó molhável proporcionou uma melhor solubilização do composto no meio, ou seja, a formulação pó molhável possibilitou a inibição do patógeno em uma quantidade menor do produto comercial utilizado (TABELA 3). Com a escolha da formulação pó molhável, pode-se obter uma maior sensibilidade da inibição do patógeno, facilitando a escolha dos pontos necessários para construção da curva de regressão.

Tabela 3. Crescimento radial do micélio de *Phytophthora parasitica* IAC 01/95 em diferentes concentrações e formulações de metalaxil, após nove dias de incubação a 25°C.

| Concentração Metalaxil ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Formulações | |
|---|---------------------------|-----------|
| | Crescimento micelial (cm) | |
| | Pó molhável | Granulado |
| Controle | 7,2aA | 7,2aA |
| 1 | 7,2aA | 7,2aA |
| 10 | 7,2aA | 7,2aA |
| 100 | 7,2aA | 7,2aA |
| 1000 | 5,0bA | 7,1aA |
| 10000 | 3,6cA | 5,2bB |

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). Letra maiúscula – comparação na linha (entre as concentrações). Letra minúscula – comparação na coluna (metalaxil).

2.3.1.3. Concentração do Ágar

As concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não afetaram o patógeno em todas as densidades de ágar. Com ágar a 1% e 3%, não ocorreu inibição do crescimento micelial

quando foi aplicado $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil, enquanto nas maiores concentrações houve inibições (TABELA 4). Entretanto, não houve diferença significativa geral entre a concentração do ágar no meio e a difusão do metalaxil. Assim, este meio não interfere significativamente na mobilidade deste princípio ativo, mas poderia ocorrer para outros metabólitos de maior peso molecular produzido pelas rizobactérias. Por isso, determinou-se usar 1,0 e 2,0% de ágar no meio, para avaliar os halos de inibição das bactérias a serem desafiadas com o patógeno, nos próximos experimentos. Se alguma das bactérias produzir halos maiores ou somente na menor concentração do ágar, seria indicativo de que o composto responsável pela inibição teria maior peso molecular do que o metalaxil.

Wolf & Gibbson (1996) trabalhando com nisina, reduziram a proporção de ágar e obtiveram um aumento de 21% na sensibilidade do ensaio. Levando-nos a crer que a densidade do meio e o tamanho da molécula podem ser fatores relevantes na análise dos resultados dos testes de antagonismos em placas.

Tabela 4. Influência da densidade do ágar na inibição do crescimento micelial do isolado IAC 01/95 de *Phytophthora parasitica*, pela aplicação pontual ($5\mu\text{g mL}^{-1}$) em diferentes concentrações de metalaxil no meio CA.

| Concentrações Metalaxil ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | % inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> | | | | | |
|---|--|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Densidade do ágar | | | | | |
| | 1% | 1,25% | 1,5% | 2,0% | 2,5% | 3,0% |
| 1 | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} |
| 10 | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} | 0 ^{aA} |
| 100 | 0 ^{aA} | 11,90 ^{aAB} | 11,94 ^{bB} | 4,47 ^{aAB} | 2,98 ^{aAB} | 0 ^{aA} |
| 1000 | 41,79 ^{bA} | 52,24 ^{bB} | 52,24 ^{cB} | 52,24 ^{bAB} | 53,73 ^{bAB} | 47,76 ^{bAB} |
| 10000 | 62,5 ^{cB} | 58,21 ^{cA} | 64,18 ^{dB} | 61,19 ^{cAB} | 59,70 ^{cAB} | 61,19 ^{cAB} |

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). Letra minúscula – comparação na linha (concentração ágar). Letra maiúscula – comparação na coluna (concentrações metalaxil)

2.3.1.4. Concentração do Metalaxil

As concentrações de metalaxil que inibiram o patógeno foram a partir de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TABELA 4), não pela ausência da substância inibitória, mas devido à pequena difusão do princípio ativo, já que, este isolado de *Phytophthora parasitica* é sensível a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (AGUILAR-VILDOSO, 1997). A difusão de substâncias em ágar está relacionada ao logaritmo da sua concentração. Isto implica, que bactérias, mesmo que não produzam halos

de inibição, podem estar produzindo substâncias inibitórias, mas em pequenas quantidades, ou pouco difusíveis.

Foi observada, também, a formação de um micélio diferenciado (atípico) nas aplicações pontuais das concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, podendo estar relacionado com a influência na alteração da fisiologia do crescimento micelial do patógeno, devido a um possível efeito fungistático do metalaxil. Entretanto, concentrações sub-letais de metalaxil levam a uma menor densidade de hifas e a modificações das mesmas, o que demonstra ser atividade fungicida e não fungistática (AGUILAR-VILDOSO, 1997).

2.3.2. TESTE DE ANTAGONISMO COM AS RIZOBACTÉRIAS

Não houve diferença de resultados de inibição nas concentrações do ágar, 1,0 e 2,0%, utilizadas nos tratamentos. Por esse motivo as duas concentrações foram agrupadas após a análise estatística.

No meio BDA, os isolados de *Paenibacillus polymyxa* (Pap2), *Pseudomonas fluorescens* (Psf2), *Serratia marcescens* (Sem), *Bacillus subtilis* (Bas) e *Pseudomonas putida* (Psp1) mostraram-se eficiente no controle do crescimento micelial do patógeno com porcentagens de inibição de 52, 38, 37, 28 e 20%, respectivamente (TABELA 5). Concordando com os resultado de Amorim (1997) que testou o isolado C2-8C de *P. fluorescens* (Psf2) que também inibiu *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, em limoeiro cravo. Além disso, Pap2 inibiu o patógeno sem reversão do crescimento micelial. No biocontrole, este comportamento vem sendo frequentemente atribuído à antibiose e, em muitos sistemas estudados, um ou mais antibióticos têm sido responsáveis pela supressão de doenças de plantas (HANDELSMAN; STABB, 1996).

Já no meio KB, 66% dos isolados inibiram *P. parasitica*, são eles: Bas, Psp1, Psp2, Psp3, Psf2, Psf4, Pss, Pap1, Pap2 e Sem, com percentuais inibitórios de 23, 39, 24, 27, 25, 29, 28, 44, 75 e 40%, respectivamente (TABELA 5). Entretanto, apenas 37% dos isolados produziram halo fluorescente de coloração verde, são elas: *Paenibacillus polimyxa* (Pap1), *Pseudomonas putida* (Psp1, Psp2 e Psp3), *P. fluorescens* (Psf4) e *P. syringae* (Pss). Ambos os isolados de *P. polymyxa* (Pap1 e Pap2) apresentaram atividade antagônica ao patógeno (FIGURA 1), mas somente o primeiro apresentou o pigmento fluorescente, sendo esta uma

característica predominante no grupo das pseudomonas (LOPER; BUYER, 1991), embora outros gêneros sejam conhecidos na literatura (FRANKOWSKI et al. 2001). Hultberg et al. (2000) trabalharam com um isolado de *Pseudomonas fluorescens* que produziu o sideróforo pioverdina e causou inibição no meio KB. Trabalhos recentes caracterizam o pigmento verde fluorescente como sendo uma característica que pode servir como marcador de algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* (MEYER, 2000).

Apenas o *Paenibacillus polymyxa* (Pap2) inibiu significativamente o patógeno, no meio CA, que é um meio rico em nutrientes e favorece o patógeno. Entretanto, os isolados Bas, Psf4, Psf2 e Sem, também inibiram, só que em menores proporções (TABELA 5). Este meio serviu para uma seleção apurada de bactérias capazes de inibir o patógeno em diferentes condições nutricionais, inclusive aquela que favorece o patógeno. Hultberg et al. (2000) avaliaram a capacidade de um isolado de *Pseudomonas* em inibir *Pythium ultimum* em um meio rico em nutrientes, e concluíram que este isolado produziu um potente metabólito antifúngico. Os resultados obtidos com *P. polymyxa* (Pap2) sugerem que ele produz um composto com um forte poder inibitório à *P. parasitica*.

O biocontrole de patógenos geralmente é atribuído a um ou mais compostos ou mecanismos, entretanto a atividade do agente de controle biológico e os mecanismos são influenciados por fatores ambientais (DILANTHA; LINDERMAN, 1995). Uma das possíveis causas da variação na resposta antagônica está relacionada à concentração de nutrientes no meio de cultura e na rizosfera, o qual afeta a produção de metabólitos secundários, por serem requeridos níveis adequados de carbono (ELAD; BAKER, 1985). Estes autores comprovaram que *Brevibacterium lines*, embora inibisse ineficientemente *Phytophthora vignae* em meio BDA, foi fortemente inibitório quando crescidas em meio TSA, conferindo que a produção de muitos compostos anti-fúngicos depende do substrato e condições ambientais.

A rizobactéria *Serratia marcescens* (Sem) apresentou um comportamento diferenciado no meio KB, o qual além de ser acompanhado visualmente (no meio de cultura) pode ser constatado através de microscopia óptica. Aos 13 dias de incubação foi observado no meio de cultura, que além do halo de inibição havia um crescimento bacteriano sobre as hifas, acompanhado facilmente pelo pigmento vermelho-vinho produzido pela bactéria. Este crescimento aconteceu quando houve um contato do

filamento de uma hifa com a colônia, permitindo, a partir deste ponto, que ela colonizasse todo o micélio sem crescer no meio de cultura (FIGURA 2A). Aos 20 dias, o micélio não era viável e as hifas apresentavam desagregação citoplasmática e uma pigmentação vermelho-claro no interior das hifas (FIGURA 2B), inclusive nas estruturas como esporângio (FIGURA 2C) e clamidósporos (FIGURA 2D). Não houve reversão do crescimento do patógeno após 30 dias de incubação. Há necessidade de maiores estudos deste modo de controle, o qual garanta que o agente de controle não seja somente eficiente no contato, mas que colonize todo o talo do patógeno.

O parasitismo, geralmente, inicia-se pela parede celular, mas neste caso, o efeito aconteceu de dentro para fora da célula. Supõe-se que o pigmento vermelho produzido pela bactéria (*Sem*) penetrou na célula, sem danificar a parede, e atingiu o conteúdo celular, danificando-o. Outras pesquisas são necessárias para se conhecer melhor este modo de ação da *S. marcescens* sobre um fungo com parede celular predominantemente composta de celulose, sendo essa bactéria conhecida como produtoras de enzimas quitinolíticas.

A bactéria *Serratia marcescens* está incluída no grupo capaz de produzir muitas enzimas quitinolíticas e atuar como agente de controle biológico (ORDENTLICH et al., 1988; FUCHS et al., 1986). Entretanto, o modo de ação aqui apresentado, indicou que não foi este tipo de enzima que atuou. Geralmente, o parasitismo inicia-se pela parede celular, mas neste caso, ocorreu uma afinidade da bactéria pelos constituintes internos, desagregando-os e levando-os a ruptura e morte celular. Esta característica é interessante quando se quer eliminar as estruturas de resistência do patógeno, como clamidósporos e oósporos, com sobrevivência em condições limitantes de 6 e 13 anos, respectivamente (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Esta bactéria tem capacidade de alterar estas estruturas de resistência, como pode ser constatada pela Figura 2, onde observa-se a desagregação citoplasmática do esporângio e clamidósporo.

O teste de laboratório onde se utiliza cultura pareada em meio de cultura apropriada, é o principal método de identificação dos mecanismos de antagonismos utilizados pelas bactérias. A produção de antibiótico e sideróforo são os mecanismos mais encontrados na literatura com responsáveis pelo biocontrole *in vitro*. O parasitismo refere-se mais ao hiperparasitismo, cujos fungos *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Penicillium* e *Humicola* são sempre os mais citados como produtores de enzimas hidrolíticas, particularmente as

celulases. Entre as bactérias, as mais conhecidas são dos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas* e *Ruminococcus* (AZEVEDO; POÇAS-FONSECA, 2002).

Tabela 5: Porcentagem de inibição do isolado IAC 01/95 de *P. parasitica* pelas rizobactérias ou a gota de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de diferentes concentrações de metalaxil, nos meios KB BDA e CA

| Tratamentos | Porcentagem de Inibição | | |
|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | KB | BDA | CA |
| Controle | - | - | - |
| M10000 | 90,98 ^a | 70,62 ^a | NR |
| Pap2 | 75,99 ^{bc} | 52,11 ^b | 43,16 ^{ab} |
| M1000 | 74,96 ^{bc} | 52,30 ^b | NR |
| M250 | 44,98 ^{cd} | NR | NR |
| Pap1 | 44,88 ^{cd} | 8,75 ^{de} | 15,16 ^{def} |
| Sem | 40,02 ^{def} | 37,02 ^{bc} | 19,66 ^{de} |
| Psp1 | 39,97 ^{def} | 20,64 ^{cd} | 1,54 ^g |
| Psf4 | 29,97 ^{fhij} | 7,59 ^{de} | 22,72 ^{cde} |
| Pss | 28,01 ^{hij} | 8,66 ^{de} | 1,54 ^g |
| Psp3 | 27,04 ^{hij} | 17,40 ^{cde} | 3,79 ^{fg} |
| Psf2 | 25,51 ^{ij} | 38,13 ^{bc} | 26,16 ^{bcd} |
| Psp2 | 24,01 ^{ij} | 14,22 ^{cde} | 0,77 ^{gh} |
| Bas | 23,47 ^{ij} | 28,42 ^{cd} | 16,93 ^{de} |
| Psf5 | 15,93 ^{lm} | 8,75 ^{de} | 15,23 ^{def} |
| Psf3 | 14,99 ^{lm} | 8,61 ^{de} | 2,29 ^{fg} |
| Psf1 | 11,23 ^{mn} | 7,59 ^{de} | 25,58 ^{cde} |
| Fli | 8,83 ⁿ | 6,53 ^{de} | 6,04 ^f |
| Esc | 6,87 ⁿ | 18,42 ^{cd} | 0,77 ^{gh} |
| Chry | 2,94 ^o | 4,30 ^e | 16,65 ^{de} |
| Média | 33,19 | 22,78 | 13,62 |

NR – não realizado

*Análise estatística pelo teste de Tukey 5%

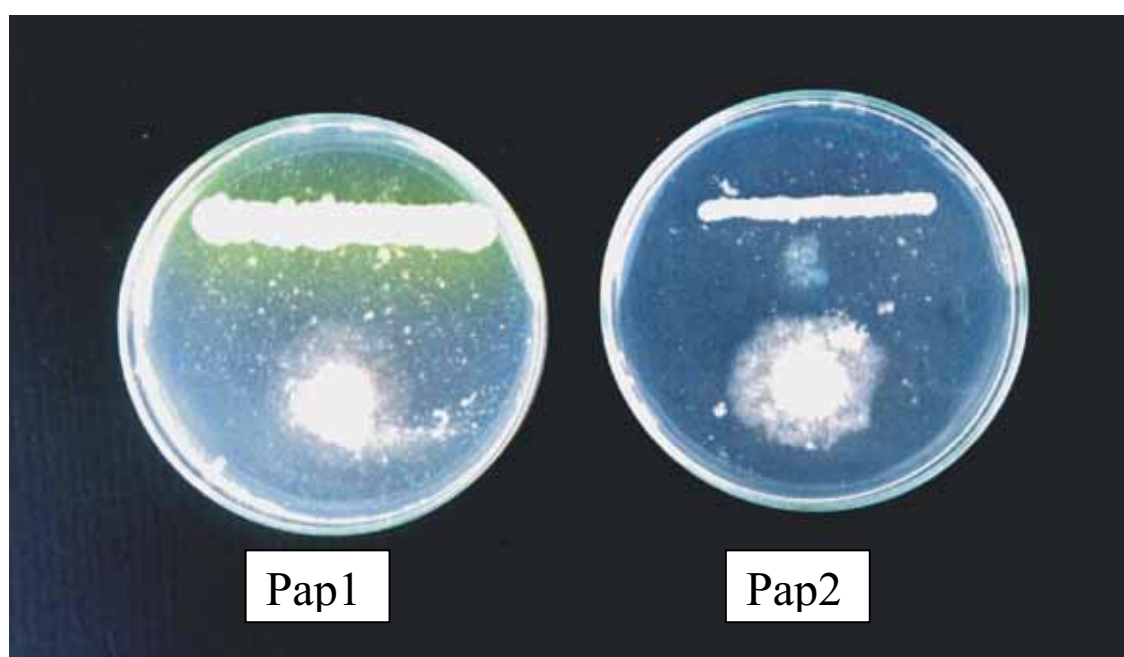


Figura 1. Antagonismo dos isolados de *Paenibacillus polymyxa* (Pap1 e Pap2) contra *Phytophthora parasitica*, em meio KB aos 13 dias de incubação

Figura 2. *Serratia marcescens* e *Phytophthora parasitica* em meio KB após 13 dias de incubação. (A) contato da bactéria com um filamento micelial do patógeno (seta) e seu percurso sobre o micélio; (B) hifas com pigmento vermelho produzido pela bactéria e sem a pigmentação; (C) esporângio pigmentado (D) clamidósporo pigmentado e uma lise celular (seta).

2.3.2.1. Quantificação da inibição

Ao ser realizado a correlação entre a concentração da gota e o halo de inibição, houve condições de estimar a concentração do metalaxil em função do halo de inibição, através de regressão linear, assim determinou-se as equações em cada meio de cultura (TABELA 6).

Tabela 6. Equações de Regressão e seus coeficientes de correlação para cada meio de cultura e seus respectivos R^2 obtidos pela medida do halo de inibição formado pela aplicação do metalaxil nos meios.

| Meio Cultura | Equação de Regressão | R^2 |
|--------------|------------------------|--------|
| BDA | $Y = 18,32x - 2,66$ | 1,00 |
| KB | $Y = 27,427x - 15,614$ | 0,9035 |

Na Tabela 7 estão os valores estimados das concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos produzidos pelos isolados bacterianos. Podemos destacar o isolado Pap2 que obteve uma concentração de $976 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BDA) e $2187 \mu\text{g mL}^{-1}$ (KB). Os isolados Pap1, Sem, e Psp1 também inibiram o patógeno com concentrações de 154, 107 e $106 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo que, apenas Pap2 e Sem inibiram *P. parasitica* com concentrações acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos dois meios de cultura. Ellis et al. (1999) trabalhando com uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* 54/96 demonstrou que sua eficácia contra *Pythium ultimum* foi equivalente ao padrão químico metalaxil. A Figura 3 mostra as placas com os halos de inibição do isolado Pap2 e da aplicação de $5 \mu\text{L}$ de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil, bem como o controle (somente com o patógeno) e *E. coli*.

As bactérias que se destacaram foram *Paenibacillus polymyxa* (Pap2), *Serratia marcescens* e *Pseudomonas fluorescens* (Psf2), concordando com os resultados obtidos por Amorim & Melo (1997) que trabalharam com o isolado de *Pseudomonas fluorescens* (Santa Bárbara), que controlou, eficientemente, *in vitro*, *P. nicotinae* var. *parasitica* e *P. citrophthora* nos meios KB e BDA.

Tabela 7. Estimativa da concentração do antibiótico das rizobactérias em $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando curvas de regressão dos fungicidas, nos meios BDA e KB.

| Tratamentos | Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$ | |
|-------------|------------------------------------|-------------------|
| | Meio BDA | Meio KB |
| M10000 | 10000 ^a | 7700 ^a |
| Pap2 | 976 ^c | 2187 ^b |
| M1000 | 1000 ^{bc} | 2006 ^c |
| M250 | NR | 162 ^d |
| Pap1 | 4 ^l | 154 ^e |
| Sem | 147 ^e | 107 ^f |
| Psp1 | 19 ^g | 106 ^g |
| Psf4 | 4 ^l | 46 ^h |
| Pss | 4 ^l | 39 ⁱ |
| Psp3 | 12 ⁱ | 36 ^j |
| Psf2 | 168 ^d | 32 ^l |
| Psp2 | 8 ^j | 28 ^m |
| Bas | 50 ^f | 27 ⁿ |
| Psf5 | 4 ^l | 14 ^o |
| Psf3 | 4 ^l | 13 ^p |
| Psf1 | 4 ^l | 10 ^q |
| Fli | 3 ^m | 8 ^r |
| Esc | 14 ^h | 7 ^s |
| Chry | 2 ⁿ | 5 ^t |
| Controle | 1 ^o | 4 ^u |

NR – não realizado; M250-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil; M1000-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; M10000-10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

*Análise estatística pelo teste de Tukey 5%, dados transformados $\text{LOG.Ln}(x + 2)$

Figura 3. Teste de antagonismo de isolados rizobacterianos ou 5 μl de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil (M.1000) contra o isolado IAC 01/95 de *P. parasitica*, em meio BDA após 13 dias de incubação.

2.4. CONCLUSÕES

As condições para o padrão químico na avaliação de halos de inibição são: 1) uma gota de 5 μL de uma solução de metalaxil, 2) deixar 5 minutos para ocorrer a absorção da solução pelo meio e 3) o teste independe da concentração do ágar no meio.

O isolado de *Paenibacillus polymyxa* foi o antagonista mais eficaz no controle de *Phytophthora parasitica*, em todos os meios testados, seguidos pela *Serratia marcescens* e *Pseudomonas putida*.

A utilização de um referencial estável nos levou a dimensionar o potencial de inibição dos isolados testados. Este comportamento reproduzível frente a um controle fixo, serve de comparação na quantidade e qualidade do metabólito produzido pelo antagonista.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-VILDOSO, C.I. Caracterização genética de estirpes de *Phytophthora parasitica*, isoladas de plantas cítricas no estado de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 98p.

AMORIM, E. P. R; MELO, I.S. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.4, 1997.

AMORIM, E.P.R. **Controle Biológico de *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* Dastur e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros.** Botucatu, 1997. 111p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista Câmpus Botucatu.

AZEVEDO, M O.; POÇAS-FONSECA, M.J. Melhoramento genético de fungos celulolíticos. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismos**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2002, cap.14, p.393-426.

BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v.68, n.9, p.1377-1383, 1978.

CABO, M.L.; MURADO, M.A.; GONZÁLES, M.P. PASTORIZA, L. A method for bacterization quantification. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.907-914, 1999.

CHROTH, M. N.; HANCICK, J. G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, n.35, p. 453-76, 1981.

DILANTHA, F.W.G.; LIDERMAN, R.G. Inibition of *Phytophthora vignae* and stem and root rot of Cowpea by soil bacteria. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.12, p.1-4, 1995.

ELAD, Y.; BAKER, R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. By *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 75, p.1053-1059, 1985.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. Cultural and biological control. In: ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**, cap 5, p.145-184, 1996.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA J.L. **Doenças causadas por Phytophthora no Brasi**, 2001, cap. 9, p. 283-342.

FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**, v.10, n.2, p.359-378, 1989.

FRANKOWSKI, J.; LORITO, M.; SCALA, F. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Archives of Microbiology**, v.176, p.421-426, 2001.

FUCHS, R.L.; McPHERSON, S.A.; DREHOS, D.J. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, p.504-509, 1986.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, v.8, p.1855-1869, 1996.

HULTBERG M.; ALSANIUS B.; SUNDIN P. *In vivo* and *in vitro* interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the suppression of damping-off in tomato seedling. **Biological Control**, v.19, p.1-8, 2000.

KING E.O.; WARD M.K.; RANEY, D.F. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal Laboratory Clinical Medical**, v.44, p.301-307, 1954.

LOPER, J.E.; BUYER, J.S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant-Microbe interactions**, v.4, n.1, p.5-13, 1991.

LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**, Jaguariúna – Embrapa Meio Ambiente, v.3, cap.6, p.141-161, 2000

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409. 1993.

MEYER, J.M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent pseudomonas species. **Archea Microbiology**, v.174, p.135-142, 2000.

ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.78, n.1, 1988.

OSBURN, R.M.; MILNER, J.L.; OPLINGER, E.S.; SMITH, R.S.; HANDELSMAN, J. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. **Plant Disease**, v.79, p.551-556, 1995.

RODES, D.J.; LOGAN, C.; GROSS, D.C. Selection of *Pseudomonas* spp. inhibitory to potato seed tuber decay. **Phytopathology**, v.76, abs.169, p.1078, 1987.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.453-476, 1981.

SOUZA, J.T. **Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp.** Thesis (Doctor) Wageningen University, The Netherlands, 157p., 2002.

SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Rhizobacteria of sugarbeets: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v.72, p.199-206, 1982.

WOLF, C.E.; GIBBONS, W.R. Improved method for the determination of nisin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, p.453-457, 1996.

COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE CITROS POR RIZOBACTÉRIAS

Este capítulo foi aceito para publicação na revista Summa Phytopathologica como: Visualização *in vitro* da colonização de raízes de citros por rizobacterias, por Queiroz, B.P.V.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Melo, I.S.

COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE CITROS POR RIZOBACTÉRIAS

RESUMO

A colonização radicular é uma condição indispensável para que bactérias possam ser selecionadas como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos de solo. Para se verificar a colonização é importante a utilização de métodos rápidos e seguros para a visualização *in vitro*. Assim buscou-se adaptar um método baseado no qual diferentes substratos foram empregados, correlacionar a visualização bacteriana na rizosfera com a colonização do rizoplano. Sementes de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck) foram bacterizadas e monitoradas utilizando-se tubos de ensaio contendo diferentes substratos para germinação das sementes. Os substratos foram preparados com os géis ágar-ágar, ágar Noble e Phytigel. Foram avaliados quinze isolados rizobacterianos proveniente das culturas de feijão, cenoura e citros, além do isolado DH5 α de *Escherichia coli* como controle negativo. Este experimento foi repetido quatro vezes, tendo cada um deles três repetições. Após 26 dias, fragmentos de raízes foram tratadas para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução. O meio de cultivo contendo Phytigel permitiu uma visualização mais nítida da colonização ao longo das raízes, pelas bactérias, e uma maior sensibilidade na confirmação de ser uma rizobactéria. Em nenhum substrato a *E. coli* teve capacidade de colonizar a rizosfera. Raízes que apresentaram turbidez no ágar, ao seu redor, mostraram colonização eficiente da sua superfície quando observadas em alta magnificação.

Palavras-chave: Rizosfera, MEV, Rizoplano, *Citrus limonia*.

CITRUS ROOT COLONIZATION BY RHIZOBACTERIA

ABSTRACT

Root colonization is an indispensable condition for bacteria to be selected as potential biological control agents against soil plant pathogens. In order to verify colonization, it is important to utilize fast and reliable methods of *in vitro* visualization. In view of this, we tried to adapt a method based on the use of different substrates, by correlating the visualization of bacteria in the rhizosphere with colonization in the rhizoplane. Cravo lemon tree (*Citrus limonia* Osbeck) seeds were bacterized and monitored by using test tubes containing different substrates for seed germination. Substrates were prepared with agar-agar, Noble agar and Phytigel gels. Fifteen rhizobacterium isolates from bean, carrot and citrus plants were evaluated, in addition to a DH5 α *Escherichia coli* isolate utilized as a negative control. This experiment was repeated four times, with three replicates each. After 26 days, root fragments were treated for observation under a high resolution scanning electron microscope (SEM). The culture medium containing Phytigel allowed the clearest visualization of bacteria colonization along the roots and greater sensitivity in establishing confirmation that the organism was indeed a rhizobacterium. *E. coli* was not able to colonize the rhizosphere in any of the substrates. Roots presenting agar turbidity in their surroundings showed an efficiently colonized surface when observed under high magnification.

Keywords: Rhizosphere, SEM, Rhizoplane, *Citrus limonia*.

3.1. INTRODUÇÃO

No estudo de rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas e principalmente, no controle biológico de fitopatógenos de solo, a colonização do sistema radicular tem merecido atenção especial por ser um requisito fundamental para o sucesso do controle biológico (MELO, 1998). Assim, no tratamento biológico de sementes visando proteção de raízes, o agente de biocontrole deve, inicialmente, crescer bem sobre a semente, e posteriormente, ao longo das raízes (HARMAN; LUMSDEN, 1990).

Vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para se observar a colonização de raízes por antagonistas como: uso de tubos de ensaio com solo (RHODES et al., 1987; SCHER et al., 1984) e placas com solo, ágar e papel de filtro (RANDHAWA; SCHAAD, 1985). Entretanto, o emprego do Ágar-ágar (ROMEIRO et al., 1999) ou do Ágar Noble (HABE; UESUGI, 2000) permite o monitoramento visual das rizobactérias, principalmente no que se refere à sua habilidade de sobrevivência, utilizando apenas os exsudatos radiculares. Desta forma, estas metodologias facilitam a seleção de um grande número de isolados rizobacterianos. A colonização da rizosfera pode ser visualizada pela formação de uma turbidez de aspecto leitoso, que se forma ao longo das raízes, em consequência do crescimento bacteriano. Para tal objetivo, quanto mais transparente o meio de cultivo melhor a visualização da colonização. Assim sendo, os substratos (géis) citados acima apresentam uma turbidez natural que, em certos casos, interferem na sensibilidade do teste.

O objetivo principal do presente trabalho foi comparar, em condições de laboratório, os substratos Phytigel (Sigma), Ágar-ágar (Difco) e Ágar Noble (Difco), na visualização da colonização radicular de limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) por rizobactérias, bem como correlacioná-las com a sua presença no rizoplano. E desta forma, facilitar a seleção de isolados rizobacterianos por um método de triagem simples de bactérias colonizadoras de raízes, candidatas a agentes de controle biológico.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Quinze linhagens de rizobactérias (TABELA 1) isoladas da rizosfera de feijoeiro, de cenoura e de citros, pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente e um isolado DH5 α de *Escherichia coli*, foram testados quanto à sua capacidade de colonizar raízes de citros. As sementes de limoeiro ‘Cravo’ utilizadas nos ensaios foram obtidas do Centro Avançado de Pesquisa do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira”- IAC.

Tabela 1. Bactérias utilizadas nos testes de colonização

| Código* | Espécie | Isolado | Hospedeiro |
|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|
| Ba | <i>Bacillus subtilis</i> | OG ¹ | Feijão |
| Psp1 | <i>Pseudomonas. putida</i> | Sta. Bárbara ¹ | Cenoura |
| Psp2 | <i>P. putida</i> | C1-1B ¹ | Citros |
| Psp3 | <i>P. putida</i> | 1-4 | Citros |
| Psf1 | <i>P. fluorescens</i> | C ₁ -S/Na ¹ | Citros |
| Psf2 | <i>P. fluorescens</i> | C ₂ -8C ¹ | Citros |
| Psf3 | <i>P. fluorescens</i> | 6-5 ₂ | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 3-6 | Citros |
| Psf5 | <i>P. fluorescens</i> | 2-3 _{1A} | Citros |
| Pss | <i>P. syringae</i> | 2-6 | Citros |
| Pap1 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 6-5 ₁ | Citros |
| Pap2 | <i>P. polymixa</i> | 3-4 | Citros |
| Fli | <i>Flavobacterium indologenes</i> | 6-5 ₃ | Citros |
| Sem | <i>Serratia marcescens</i> | R3-5 | Citros |
| Chry | <i>Chryseobacterium sp</i> | 2-3 _{1L} | Citros |
| Esc | <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | Comercial |

* código de identificação

¹ pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Inicialmente, as sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool 70% (2min), hipoclorito de sódio 2% (10min) e lavadas sucessivamente com água destilada esterilizada. Os inóculos bacterianos foram produzidos em caldo nutriente (peptona 5g, extrato de carne 3g L⁻¹, pH 6,8-6,9), e incubados a 27°C por 24 horas. Após este período, as sementes desinfestadas foram imersas nas suspensões bacterianas nas concentrações de 10⁷ a 10⁸ bactérias mL⁻¹ (escala de McFarland) e incubadas por 1 hora. Em seguida, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio, contendo os seguintes substratos: ágar

noble:água (0,8% p/v), ágar-ágar:água (0,8% p/v) e phytigel:água (0,8% p/v), sem fonte adicional de nutrientes. Foram semeadas 2 sementes por tubo de ensaio de 150 mm de comprimento por 25mm de diâmetro, em triplicata. Todos os tubos, foram fechados com tampão de algodão e incubados à 28°C, sob luz constante. Para controlar a luminosidade nas raízes os tubos foram cobertos externamente com papel, até altura do gel.

Os tubos foram avaliados, periodicamente, quanto a germinação das sementes, presença de pêlos radiculares, comprimento da raiz e parte aérea. No 26º dia de incubação, os substratos foram observados com relação a translucidez e a presença ou não de bactérias ao redor do sistema radicular. Adotou-se como critério para avaliação: (-) sem colonização; (+) pouca colonização; (++) colonização intermediária em partes da raiz; (+++) colonização abundante ao longo de toda a raiz e (p) podridão da semente.

Raízes bacterizadas com algumas linhagens foram selecionadas para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), tendo sido considerado os seguintes critérios: inóculo bacteriano, nível de colonização e indução de pêlos radiculares. Para isso, segmentos de raízes foram fixados em glutaraldeído 2% preparado com tampão fosfato de sódio 0,1M; desidratadas por uma série alcoólica (15, 30, 60, 70, 95 e 100%); secas ao ponto crítico e, em seguida, metalizados com fina camada de ouro. Observações ultraestruturais foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta resolução (Modelo Leo 982 GEMINI DMS - Zeiss e Leica), da Embrapa Meio Ambiente e foto documentadas.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os substratos utilizados foi possível a visualização da colonização das raízes (Figura 1), como descrito por Romeiro et al. (1999) e Habe & Uesugi (2000). No entanto, os substratos utilizados, ágar-ágar e ágar noble, por apresentarem uma turbidez natural, prejudicaram a visualização da colonização em alguns casos. Além disso, o ágar noble apresenta também a desvantagem de ser muito oneroso. O Phytigel demonstrou ser o gel mais indicado para esses estudos, pois permitiu uma melhor visualização da colonização de raízes *in vitro* (TABELA 2). Foi possível a visualização clara de 12 isolados com esse gel, enquanto que nos outros dois substratos foram apenas oito.

O Phytigel demonstrou-se o mais indicado para estudos envolvendo a observação de bactérias na colonização de raízes *in vitro* (TABELA 2), onde 12 isolados foram observados, enquanto que nos outros dois substratos, foram apenas oito.

Entre as bactérias rizosféricas avaliadas, 75% colonizaram o sistema radicular, assim, visualizado pela transparência do substrato. Considerando os resultados do Phytigel, as bactérias Psp1, Psp3 e Chry colonizaram de forma intermediária a abundante, enquanto que Psf1; Psf5, e Sem, de forma intermediária. Os isolados de *Escherichia coli* DH5 α (Esc), *P. syringae* (Pss), e *Paenibacillus polymyxa* (Pap1) não demonstraram, nestas condições, capacidade de colonizar as raízes de citros ou, uma outra explicação poderia ser que, por estarem abaixo do limite da técnica não foram visualizados pela metodologia. O isolado Pap2 de *P. polymyxa* causou apodrecimento das sementes (TABELA 2)

A colonização da rizosfera ocorre em várias fases, sendo a manutenção e persistência da bactéria, a fase crucial, pois os exsudatos das raízes são utilizados para a multiplicação e sobrevivência dos isolados nesse ambiente.

Foi observado, ainda, que os isolados Psf1 e Psf5 de *P. fluorescens* promoveram um aumento dos pêlos radiculares e crescimento da plântula, enquanto que *Serratia marcescens* (Sem), além do efeito no crescimento, estimulou a germinação das sementes (dados não mostrados). O aumento dos pêlos radiculares pode estar relacionado à produção de citocininas ou aumento da sensibilidade das células radiculares, como já foi constatado com a inoculação de isolados de *P. fluorescens* e *P. putida* (NIETO; FRANKENBERGER,

1989). Essa emissão de pêlos radiculares e raízes é bem caracterizada para *Agrobacterium rhizogens* (KLEE; ESTELLE, 1991). Os efeitos no tamanho das plântulas e na germinação vêm sendo relatados para estas espécies, as quais são denominadas promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e de emergência de plântulas (RPE) (BULL et al., 1991, DELANY et al., 2001). Além do grupo das *Pseudomonas*, novos grupos vêm sendo descobertos como as *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Beijerinckia* spp. (KLOEPPER et al., 1986).

Figura 1. Aspecto da raiz de limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) colonizada por isolados rizobacterianos em diferentes substratos, após 26 dias da inoculação das sementes. (a) ágar-ágar com isolado Psp2 de *Pseudomonas putida*; ágar Noble, isolado Chry de *Chryseobacterium* sp e Phytigel isolado Psf4de *P. fluorescens*. (b) Detalhe da colonização, ao longo da raiz, do isolado Psp1 de *P. putida* no substrato Phytigel.

| | | | |
|-----------|------------|----------|-------------------------|
| Ágar-Ágar | Ágar Noble | Phytigel | Phytigel (isolado Psp1) |
| | (a) | | (b) |

A aplicação de rizobactérias em sementes e o crescimento em condições onde existe a ausência de qualquer outra fonte de carbono disponível, podem proporcionar uma seleção de rizobactérias mais bem adaptadas a determinadas plantas. A capacidade de crescimento nessas condições indica que esses isolados são bem adaptados e podem se multiplicar eficientemente nesse ambiente. Além disso, indica que foi possível selecionar aquelas que são quimiotaticamente atraídas e/ou que são capazes de metabolizar esses exsudatos, possuindo desta forma, uma alta afinidade com as raízes da planta. Alguns estudos demonstram que os exsudatos fornecem os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (BOWEN, 1980).

Isolados que apresentaram uma boa capacidade de colonização *in vitro* têm chances de atuarem como uma barreira mecânica à ação de fitopatógenos do solo (DAZZO et al., 1984). Donde se supõe que uma colonização variável seja, provavelmente, uma razão para que o controle biológico seja inconsistente (GODDARD et al., 2001, WELLER, 1988).

Tabela 2. Avaliação da colonização das radículas de limoeiro cravo pelas bactérias *in vitro*, em diferentes substratos, após 26 dias de incubação. A *E. coli* foi utilizada como controle negativo.

| Isolados | Phytigel | Ágar Noble | Ágar-ágar |
|----------|----------|------------|-----------|
| Controle | - | - | - |
| Bas | ++ | + | - |
| Psp1 | +++ | +++ | ++ |
| Psp2 | ++ | + | +++ |
| Psp3 | +++ | - | ++ |
| Psf1 | ++ | + | ++ |
| Psf2 | + | - | - |
| Psf3 | ++ | ++ | ++ |
| Psf4 | ++ | ++ | - |
| Psf5 | + | * | + |
| Pss | - | - | - |
| Pap1 | - | - | - |
| Pap2 | p | p | p |
| Fli | + | - | - |
| Sem | ++ | ++ | + |
| Chry | +++ | +++ | + |
| Esc | - | - | - |

(-) sem colonização; (+) pouca colonização; (++) colonização intermediária em partes da raiz; (+++) colonização abundante ao longo da raiz; (p) podridão da semente, (*) amostra contaminada.

A microscopia eletrônica detectou colonização de bactérias em todos os tratamentos. Entretanto, houve variações quantitativas. O comportamento no rizoplane pode ser caracterizado. Por exemplo: colonização homogênea e abundante (Psp1, Chry), agrupamentos em colônias (Bas, Chry, Psp2, Psf1, Psf2, Psf4, Sem), formação de colônias sob mucilagem (Psp3, Psf1, Psf4, Sem) e de células individualizadas (Fli, Esc).

As fotos da Figura 2 mostram a distribuição espacial das bactérias no rizoplane das raízes de citros: (A) Esc de *E. coli* mostrou poucas células isoladas sobre o rizoplane; (B) Psp3 com intensa colonização sob uma camada mucilagínosa; (C) Chry, agrupados em microcolônias; (D) Psf1, colonização homogênea também sob mucilagem.

Os grupos das *Pseudomonas* colonizaram tanto a rizosfera como o rizoplane, concordando com diversos trabalhos, principalmente, *P. fluorescens* e *P. putida* (LUGTENBERG et al., 2001). Portanto, indicam essas bactérias como colonizadoras eficientes e como possíveis boas candidatas como agentes de biocontrole. Entretanto, outros gêneros importantes, tal como *Bacillus*, eficientes no biocontrole, são descritos como colonizadores fracos (FUKUI et al., 1994; LUGTENBERG et al., 2001). Concordando com o observado nos ensaios com o isolado de *B. subtilis* (OG), que colonizou o sistema radicular de forma intermediária e fraca nos substratos Phytigel e ágar Noble, respectivamente.

Estudos utilizando a microscopia eletrônica clássica e marcadores genéticos têm mostrado uma variação na distribuição da bactéria sobre as raízes (SHAW et al., 1992; GODDARD et al., 2001), na qual algumas áreas são livres de bactérias e outras densamente colonizadas (HABE; UESUGI, 2000; LUGTENBERG et al., 2001; MEHARG; KILLHAM, 1995), concordando com os resultados observados nas amostras visualizadas através da MEV.

A produção de mucilagem por algumas espécies rizobacterianas, tem sido descrita na literatura como um dos processos responsáveis pela sua adesão às raízes (CHIN-A-WOENG et al., 1997; GREAVES; DARBYSHIRE, 1972, ROVIRA; CAMPBELL, 1974). Anderson et al. (1988) e Tari & Anderson (1988), para comprovar este fenômeno mostraram que uma linhagem de *P. putida* aglutinou-se às raízes de feijoeiro e pepino através de seu complexo de glicoproteínas, enquanto que seu mutante negativo (não produtores de glicoproteínas) aderiu às raízes em menor extensão.

Em todos os ecossistemas naturais, a aderência de microrganismos em superfícies é um fato comum. Dazzo et al. (1984) descreveram o processo em duas fases: a primeira, de caráter reversível, na qual o microrganismo pode usar o quimiotactismo ou produzir polímeros para ficar próximo à superfície da raiz; na segunda, são sintetizados exopolissacarídeos cuja aderência ao substrato é irreversível. Rodovira & Campbel (1974) observaram, através da MEV, bactérias colonizadoras de raízes de trigo produzindo material mucilaginoso em algumas áreas da planta livres de mucilagem.

Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura: (a) *E. coli*, poucas células bacterianas sobre a epiderme (2.000x, 8kv, 20µm); (b) isolado Psp3 de *P. putida* mostrando uma densa camada mucilaginosa (5.000x, 5kv, 5µm) (c) isolado Chry de *Chryseobacterium* sp. células agrupadas em colônias no sistema radicular (5.000x, 5kV, 5µm). (d) isolado Psf1 de *P. fluorescens* sob uma camada mucilaginosa (390x, 15kV, 100µm).

3.4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que houve uma concordância entre a visualização da colonização da rizosfera, via tubos de ensaio, e do rizoplano via MEV. Desta forma, a seleção de colonizadores poderá ser simples, rápida e com baixos custos. Entre os géis utilizados o Phytigel proporcionou uma melhor visualização da colonização microbiana na rizosfera de citros.

Nas condições ambientais utilizadas neste trabalho, os isolados de *Pseudomonas putida* (Psp1 e Psp3) e *Chryseobacterium* (Chry) foram os melhores colonizadores da rizosfera das plântulas de citros.

Agradecimentos:

Ao Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” – APTA-IAC, através da clínica de fitopatologia pelo suporte técnico e apoio e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, T.A.; TARI, P.H.; TEPPER, C.S. Molecular studies on the role of the root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.375-380, 1988.
- BOWEN G.D. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: Ellwood D.C., Hedger J.N., Lathan M.J., Lynch J.M. and Slater J.H. (Eds.). **Contemporary Microbial Ecology**. Academic Press, London, 1980, p.283-304.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. **Phytopathology**, v.81, p.954-959, 1991.
- CAMPBELL, R.; ROVIRA, A.D. The study of the rhizosphere by scanning electron microscopy. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.747-752, 1973.
- CHIN-A-WOENG, T.F.C.; PRIESTER, W.; VAN DER B.I.J.; LUGTENBERG, B.J.J. Description of the Colonization of a Gnotobiotic Tomato Rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strain WCS365, Using Scanning Electron Microscopy. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.1, 1997, p.79-86.
- DAZZO, F.B; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.; ABE, M.; PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* clover symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.6, p.1140-1150, 1984.
- DE WEGER, L.A.; DUNBAR, P.; MAHAFEE W.; LUGTENBERG, B.J.J.; SAYLER, G.S. Use of bioluminescence markers for detection of *Pseudomonas* bacteria in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3641-3644, 1991.
- DELANY, I.R.; WALSH, U.F.; ROSS, I.; FENTON, A.M.; CORKERY, D.M.; O'GARA, F. Enhancing biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F 113 by altering the regulation and production of 2,4-diacetylphloroglucinol. **Plant and Soil**, v.232, p.195-205, 2001.

- FUKUI, W.C.; POINAR, E.I.; BAUER, P.H.; SCHROTH, M.N.; HENDSON, M. Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. **Phytopathology**, v.84, p.1338-1345, 1994.
- GODDARD, V.J.; BARLEY, M.J.; DARRAH, P.; LILLEY, A.K. THOMPSON, I.P.. Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: A community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. **Plant and Soil**, v.232, p.181-193, 2001.
- GREAVES, M.P.; DARBYSHIRE, J.I. The ultrastructure of the mucilaginous layer of plant roots. **Soil Biological and Biochemistry**, v.4, p.443-449, 1972.
- HABE, M.H.; UESUGI. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia brasileira**, v.25, n.4, p.657-660, 2000.
- HARMAN, G.E.; LUMSDEN, R.D. Biological disease control. In: LYNCH, J.M. (Ed). **The Rhizosphere**. John Willey & Sons, New York, 1990, cap.10, p.259-280.
- KLEE, H.; ESTELLE, M. Approaches to plant hormone biology. **Annual Review of Plant Physiology**, v.42, p.529-551, 1991.
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERT, M.; TIPPING, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: SWINBURNE, T.R., ed. **Iron, Siderophores and Plant Diseases**. New York: Plinun Press, p. 155-181, 1986.
- LUGTENBERG, B.J.J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonads, **Annual Review of Phytopathology**, v39, p.461-490, 2001.
- MEHARG, A.A.; KILLHAM, K. Loss of exudates from roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. **Plant and Soil**, v.170, p.345-349, 1995.
- MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: Descrição e Potencial de Uso na Agricultura. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Ed). **Ecologia Microbiana**. Embrapa-Jaguariúna, 1998, cap. 3, p.87-116.
- NIETO, K.F.; FRANKENBERGER JR, W.T. Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.967-972, 1989.
- RANDHAWA, P.S.; SCHAAD, N.W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, v.75, p.254-259, 1985.

- RHODES, D.J.; LOGAN, C.; GROSS, D. Selection of *Pseudomonas* spp. inhibitory to potato seed tuber decay. **Phytopathology**, v.76, p.1078, 1987 (abstract 169).
- ROMEIRO, R.S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H.; MOURA, A.B.; SILVA, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (suplemento), p. 255. 1999 (Resumo 57)
- ROVIRA, A.D.; CAMPBELL, R. Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. **Microbial Ecology**, v.1, p.15-23, 1974.
- SCHER, F.M.; ZIEGLE, J.S.; KLOEPPER, J. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.151-157, 1984.
- SHAW, J.J.; DANE, F.; GEIGER, D.; KLOEPPER, J.W. Use of bioluminescence for detection of genetically-engineered microbes released into the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p.267-273, 1992.
- TARI, P.H.; ANDERSON, A.J. Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2037-2041, 1988.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.

**RIZOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CITROS**

RIZOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CITROS

RESUMO

A utilização de rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas e no aumento da produção vem sendo isoladas e testadas intensivamente nas últimas décadas. Dessa forma, testou-se o efeito da bacterização com 15 isolados de rizobactérias e *Escherichia coli*, em sementes de limão cravo (*Citrus limonia*), nas seguintes condições: solo solarizado, solo autoclavado e substrato comercial Plantmax®. *E.coli* foi utilizada como controle negativo por não apresentar capacidade de colonizar raízes. As sementes foram desinfestadas superficialmente e imersas na suspensão bacteriana por 2 hora. Em seguida elas foram semeadas em solo solarizado e mantidas em câmara de incubação à 27°C, por 63 dias; em solo autoclavado e crescidas em telado por 100 dias; e em substrato Plantmax®, em sala climatizada a 25°C por 100 dias. Em solo solarizado a maioria dos isolados promoveu o crescimento da planta, tanto na altura como no comprimento da raiz, bem como a massa da matéria seca da parte aérea e raiz, quando comparado com a testemunha e o controle negativo. Os isolados Psf1, Bas e Psp2, merecem destaque, pois resultaram em um aumento de 87% da matéria seca em relação a testemunha. Em solo autoclavado não houve diferença significativa na altura da planta e no comprimento da raiz. Já em relação à massa da matéria seca da parte aérea e raízes, os isolados Psp1 e Psf1 promoveram um aumento em relação ao controle.

Palavra chave: PGPR, *Citrus limonia*

RHIZOBACTERIA AS CITRUS SEEDLING GROWTH PROMOTERS

ABSTRACT

The use of rhizobacteria as plant growth promoters and to increase yield has been the object of isolation and intense testing in the past decades. Therefore, the effect of bacterization was tested on cravo lemon tree seeds (*Citrus limonia*) using 15 rhizobacteria and *Escherichia coli* isolates, under the following conditions: solarized soil, autoclaved soil and the commercial substrate Plantmax®. *E. coli* was utilized as a negative control, since it lacks the ability to colonize roots. The seeds were surface disinfested and immersed in the bacterial suspension for 2 hours. Next they were sown in solarized soil and maintained in an incubator at 27°C for 63 days, or in autoclaved soil and grown in a shade house for 100 days, or in the Plantmax® substrate in an air-conditioned room at 25°C for 100 days. Most isolates in the solarized soil promoted plant growth, in both root height and length, as well as in dry matter mass of the aerial part and root, when compared with the control and the negative control. Isolates Psf1, Bas and Psp2 deserve to be distinguished, since they resulted in an 87% dry matter increase relative to the control. There were no significant differences in plant height and root length in the autoclaved soil. However, isolates Psp1 and Psf1 promoted dry matter mass increases in the aerial part and roots, relative to the control.

Keywords: PGPR, *Citrus limonia*

4.1. INTRODUÇÃO

A rizosfera é uma região altamente povoada por diferentes microrganismos, tanto benéficos como deletérios. Os microrganismos benéficos podem influenciar o crescimento de plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes (LIFSHITZ et al. 1987), da produção de hormônios de crescimento, como giberelinas e auxinas (BROWN, 1972) e da supressão de microrganismos deletérios na rizosfera das plantas (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Entre os microrganismos mais estudados, podem ser citados: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, entre outros.

Pseudomonas tem sido o gênero mais estudado, isto devido a sua elevada população no solo, por ser nutricionalmente versátil, crescer em uma ampla faixa de condições ambientais e, principalmente, sua grande capacidade de suprimir patógenos (LUCON, 1992). A grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal produzidos por bactérias deste gênero geram um grande interesse por parte de pesquisadores neste grupo bacteriano.

Balota & Kanashiro (1998) relataram que o uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) tem sido pouco estudado na citricultura, mas com muito potencial na sua aplicabilidade, principalmente, na proteção de mudas e no favorecimento de populações no manejo do pomar.

Já para o tratamento de substratos existe um método alternativo que tem sido empregado com sucesso; a solarização de substratos de viveiros e áreas no campo, cuja técnica consiste em um método físico de desinfestação para o controle de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas, onde um plástico transparente cobre o solo úmido em pré-plantio durante o período do ano de maior radiação solar (KATAN, 1980). Existem ainda, coletores solares para tratamento de substratos para viveiros (GHINI, 1993). Parte da população de fitopatógenos é inibida ou eliminada pela exposição a altas temperaturas. Katan (1981) descreve que os microrganismos saprófita, entre eles os antagonistas, toleram temperaturas maiores do que os fitopatógenos. A microbiota que resiste a este tratamento é favorecida pela menor competição existente no ambiente e, desta forma, multiplica-se mais rapidamente favorecendo o controle de patógenos e a disponibilidade de nutrientes às

plantas. Sinigaglia et al. (2001) citam vários trabalhos em que foram constatados benefícios com a solarização onde, além do controle de fitopatógenos, foi observado um maior crescimento das plantas. Estes mesmos autores comprovaram a eficiência da solarização como método alternativo ao emprego dos métodos químicos convencionais.

A utilização de diferentes condições, tanto de substrato como de nutrientes, temperatura, entre outras, têm sido bastante utilizadas nos bioensaios (LARKIN; FRAVEL, 2002). As diferentes técnicas visaram o estabelecimento das condições ideais de cultivo e melhor eficiência no desempenho proposto para o microrganismo. A técnica da solarização induz a liberação de nutrientes no solo pela morte e degradação microbiana (KATAN, 1980), propiciando melhores condições para os microrganismos introduzidos e a planta. Já em condições de esterilização, alguns nutrientes podem ficar deficientes, mas não existirá a competição com outros microrganismos, obtendo-se, supostamente, o efeito apenas do microrganismo adicionado. Já o emprego de substrato natural (sem tratamento) ocorrerá a competição por espaço e nutrientes, ou seja, é um desafio para os microrganismos introduzidos.

Avaliando-se as últimas décadas das pesquisas com RPCP, observa-se que houve um crescente interesse por essas bactérias devido aumento no número de publicações. Muitos microbiologistas têm apontado vantagens e desvantagens nos sistemas experimentais *in vitro* e em *in vivo* (ELLIOT et al. 1984; ATLAS, 1986). Muitos fatores significantes que afetam a atividade microbiana na natureza podem ser eliminados quando os estudos são conduzidos *in vitro*. Enquanto que, nos ensaios *in vivo*, o controle é mais difícil de ser atingido devido às muitas variáveis que existem, tais como: competição, instabilidade do isolado, presença de microrganismos deletérios, minerais presentes no solo, entre outros (SCHIPPER et al., 1987).

Numa tentativa de se desenvolver um método alternativo para obtenção de mudas de citros com uso de microrganismos eficientes é que este trabalho foi desenvolvido. Dessa forma, o propósito foi de selecionar rizobactérias capazes de promover o crescimento de plântulas de citros em diferentes substratos e condições ambientais.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Microrganismos utilizados e métodos de preservação

Foram utilizadas quinze linhagens de rizobactérias, isoladas de citros e duas outras, uma do rizoplano de feijoeiro (OG) e outra de cenoura (Santa Bárbara). Um controle negativo, *Escherichia coli* foi incluído (TABELA 1). As linhagens encontram-se depositadas no Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP. Estas bactérias foram testados quanto a capacidade de promover o crescimento de plântulas de citros (*Citrus limonia* Osbeck) em um Latossolo vermelho-amarelo (TABELA 2), tratado com solarização ou autoclavagem e um substrato comercial (Plantmax®) sem tratamento. As bactérias foram mantidas em frascos contendo meio NA inclinado sob óleo mineral Nujol, durante o período experimental.

Tabela 1. Bactérias testadas nos bioensaios de promoção de crescimento

| CÓDIGO ¹ | ESPÉCIES | ISOLADOS | HOSPEDEIRO |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------|
| Bas | <i>Bacillus subtilis</i> | OG* | Feijoeiro |
| Psp1 | <i>Pseudomonas. putida</i> | Sta. Bárbara* | Cenoura |
| Psp2 | <i>P. putida</i> | C1-1B* | Citros |
| Psp3 | <i>P. putida</i> | 1-4 | Citros |
| Psf1 | <i>P. fluorescens</i> | C ₁ -S/Na* | Citros |
| Psf2 | <i>P. fluorescens</i> | C ₂ -8C* | Citros |
| Psf3 | <i>P. fluorescens</i> | 6-5 ₂ | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 3-6 | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 2-3 _{1A} | Citros |
| Pss | <i>P. syringae</i> | 2-6 | Citros |
| Pap1 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 6-5 ₁ | Citros |
| Pap2 | <i>P. polymyxa</i> | 3-4 | Citros |
| Fli | <i>Flavobacterium indologenes</i> | 6-5 ₃ | Citros |
| Sem | <i>Serratia marcescens</i> | R3-5 | Citros |
| Chry | <i>Chryseobacterium</i> sp | 2-3 _{1L} | Citros |
| Esc | <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | Comercial |

* pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

1. código de identificação

Tabela 2. Análise química do Latossolo vermelho - amarelo empregado nos experimentos.

| Atributos | |
|--|------|
| pH (em CaCl ₂) | 5,1 |
| Matéria orgânica (g dm ⁻³) | 25 |
| P (mg dm ⁻³) | 14 |
| K (mmol dm ⁻³) | 2,6 |
| Ca (mmol dm ⁻³) | 19 |
| Mg (mmol dm ⁻³) | 11 |
| Soma de bases (mmol dm ⁻³) | 32,6 |
| H + Al (mmol dm ⁻³) | 28 |
| CTC (mmol dm ⁻³) | 60,4 |
| V (%) | 54 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 31 |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 10,4 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 0,8 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 3,3 |
| B (mg kg ⁻¹) | 0,19 |

4.2.2. Bacterização das Sementes

Sementes de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (5min), hipoclorito de sódio 2% + tween (20min), seguido de sucessivas lavagens com água destilada esterilizada. A última água de lavagem foi semeada em meio nutriente ágar (NA) e as placas incubadas para observar o crescimento de contaminantes. As bactérias foram crescidas separadamente em tubos de ensaio com meio NA inclinados e incubadas a 27°C por 48 horas. Após este período foi adicionada solução salina (0,85%) esterilizada, seguindo agitação e a transferência da suspensão de células bacterianas para outro tubo. As sementes desinfestadas foram imersas nas suspensões rizobacterianas (concentrações de 10⁸ UFC mL⁻¹ pela escala de McFarland) e incubadas por 2 horas. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina (0,85%) esterilizada.

Este procedimento foi utilizado nos três experimentos descritos a seguir.

4.2.3. Experimentos

Foram realizados três experimentos: no **primeiro** as sementes foram bacterizadas e plantadas em copos de plástico (200 mL) contendo a mistura de solo:areia (8:2), previamente solarizada (coletor solar da Embrapa Meio Ambiente), e incubadas em câmara a 27°C por um período de 62 dias. Cada parcela continha quatro sementes com três repetições; no **segundo**, as sementes foram germinadas em solo autoclavado, em vasos de 500 mL com a mesma mistura do experimento anterior. Foram utilizadas quatro sementes por vaso com cinco repetições. Os tratamentos foram incubados em telado por 100 dias; e no **terceiro**, as sementes bacterizadas foram germinadas em sacos para mudas de 450 mL com substrato comercial Plantmax®. Foram semeadas quatro sementes por tratamento, com três repetições. Os tratamentos foram incubados em sala climatizada a 25°C por 100 dias sob luz constante.

4.2.4. Avaliação

A avaliação da promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias foi baseada na altura da planta, no comprimento da raiz principal e na massa do peso seco total (parte aérea + raiz) no ensaio com substrato solarizado, a parte aérea separada da raiz nos demais experimentos. A massa de matéria seca das plantas foi obtida pela colocação das plantas em sacos de papel e secagem em estufa a 65°C, até a obtenção do peso constante. A massa da matéria seca foi determinada em balança analítica. Foram avaliadas todas as plântulas germinadas por vaso e a medida das plantas de cada unidade experimental foi considerada uma repetição.

4.2.5. Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental do primeiro ensaio foi inteiramente casualizado, e nos outros dois foram em blocos inteiramente casualizados. Em todos os ensaios as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio com a mistura solo:areia solarizada, todos os tratamentos favoreceram o desenvolvimento das plântulas de citros, nos parâmetros avaliados, diferindo apenas do controle negativo (Esc), quando comparados com a testemunha. Os isolados que se destacaram no aumento da massa da matéria seca da planta foram: Psf1, Bas, Psp2, com peso de 0,17, 0,15 e 0,15g, respectivamente, equivalendo a 750, 650, 650%, respectivamente (TABELA 3). Estes isolados estimularam tanto o desenvolvimento da parte aérea com 5,7, 6,0 e 5,0 cm de altura respectivamente (190, 200 e 180%), como do sistema radicular, com comprimento de 11,3, 10,2 e 10,0 cm respectivamente (606, 538 e 525%). As sementes tratadas com os isolados Psp1, Psf2, Psf3 e Psf4 não germinaram até o final do experimento.

Como já era esperado, pelo que já se conhece dos efeitos da solarização do solo, houve um maior número de isolados que promoveram o crescimento das plântulas. Nessas condições pode ter ocorrido devido as alterações químicas no solo, tais como a liberação de nutrientes pela microbiota morta e degradada que passaram a compor a solução do solo (SOUZA, 1994), ou seja, pode ter havido uma maior disponibilização de nutrientes para as plântulas, inclusive de minerais como nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio (LEFÈVRE; SOUZA, 1993). O curto período de 62 dias para o encerramento do experimento pode ter influenciado positivamente o efeito na promoção de crescimento das plântulas, levando-nos a crer que o estímulo fornecido pelas rizobactérias pode ter sido maior nas primeiras semanas após a germinação.

No segundo ensaio, com a mistura solo:areia autoclavada, não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação a altura da parte aérea e comprimento da raiz. Discordando do trabalho de Amorim & Melo (2002), que observaram a promoção do crescimento nesses parâmetros por isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus subtilis*. Entretanto, os isolados Psp1 e Psf1 aumentaram a massa da matéria seca, tanto da parte aérea com 0,63 e 0,64g (200, 204%), respectivamente, quanto das raízes com 0,78g (212%), em relação à testemunha (TABELA 4). A *E coli* (Esc) obteve um pequeno aumento na altura da parte aérea em relação ao controle, talvez devido a ocupação de nicho e/ou uma disponibilização de nutrientes às plântulas.

Sabe-se que a bacterização de sementes ou raízes pode induzir aumento no crescimento das plantas (BROWN, 1974). Entretanto, a época da avaliação pode ser importante quando se mensura altura da parte aérea e comprimento de raiz, motivo que pode justificar a diferença de resultados em relação aos ensaios. Verificou-se ainda, que as bactérias que não foram isoladas da rizosfera de citros (Bas e Psp1) também promoveram o crescimento das plântulas. Estes resultados indicam que elas não apresentaram especificidade, podendo ser aplicadas em diversas culturas. Esses mesmos isolados também estimularam o crescimento de pepino e tomate nos trabalhos realizados por Melo et al. (1995).

Já com o substrato Plantmax®, não houve diferença estatística em todos os tratamentos, nos parâmetros avaliados. Apesar disso, o tratamento com o isolado Psp1 obteve aumento percentual expressivo com relação à massa da matéria seca da parte aérea com peso de 0,0473g (154%) e do sistema radicular com 0,0321g (214%) (TABELA 5), quando comparado com a testemunha (0,0186 e 0,0102g, respectivamente).

As condições ambientais utilizadas neste experimento, como luminosidade e umidade, podem ter prejudicado o desenvolvimento das plântulas. A competitividade propiciada pelo substrato utilizado, o qual não tinha sofrido nenhum tratamento que alterasse a sua microbiota nativa, poderia ter tido um efeito negativo no estabelecimento dos isolados testados, inibindo o efeito de promoção de crescimento das plântulas dos isolados testados. Este comportamento já era esperado, pois a competitividade ainda é um fator determinante para o estabelecimento das rizobactérias no rizoplano. A microflora nativa, na maioria dos casos, coloniza rapidamente as sementes e as raízes e, desta forma, inibi os microrganismos introduzidos, perdendo a capacidade de promover o crescimento da planta e de bioproteção (LUZ, 1993).

Entretanto, a promoção do crescimento de plantas por rizobactérias é extensivamente relatada na literatura, agindo muitas vezes, pela inibição de microrganismos deletérios e produção de hormônios do crescimento. Gardner et al. (1984) observaram a promoção do crescimento de plantas de citros por *Pseudomonas*. Experimentos comprovam o estímulo de rizobactérias no aumento da produção e crescimento de plantas em diferentes culturas (AMORIM, 1997; BENT, et al., 2001; AMORIM; MELO, 2002;). Outros

pesquisadores demonstraram que o aumento no crescimento de plantas promovido por isolados do grupo *P. fluorescens* e *P. putida* foi frequentemente acompanhado por reduções na população de fungos e bactérias da rizosfera, e que estes isolados benéficos também foram eficientes agentes de biocontrole de alguns patógenos de solo (SCHROTH; HANCOCK, 1981)

Tabela 3: Comprimento de raiz, altura da parte aérea, massa da matéria da plântula (raiz + parte aérea), com e sem bacterização da semente de limão cravo em solo solarizado após 63 dias da incubação.

| Tratamento 10 ⁸ UFC mL ⁻¹ | Altura parte aérea (cm) | Comprimento raiz (cm) | Massa da matéria seca planta (g) |
|--|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Testemun. | 2,0 ^c | 1,6 ^c | 0,0185 ^h |
| Bas | 6,0 ^a | 10,2 ^{ab} | 0,15 ^{ab} |
| Psp1 | - | - | - |
| Psp2 | 5,6 ^{ab} | 10,0 ^{ab} | 0,15 ^{ab} |
| Psp3 | 5,7 ^{abc} | 6,8 ^{ab} | 0,09 ^{cdef} |
| Psf1 | 5,7 ^{ab} | 11,3 ^a | 0,17 ^a |
| Psf2 | - | - | - |
| Psf3 | - | - | - |
| Psf4 | - | - | - |
| Psf5 | 5,8 ^{ab} | 8,0 ^{ab} | 0,12 ^{bc} |
| Pss | 5,3 ^{abc} | 9,2 ^{ab} | 0,11 ^{bcd} |
| Pap1 | 4,4 ^{abc} | 9,3 ^{ab} | 0,10 ^{cde} |
| Pap2 | 3,7 ^{abc} | 6,4 ^{bc} | 0,07 ^{defgh} |
| Fli | 3,0 ^{abc} | 7,8 ^{ab} | 0,04 ^{gh} |
| Sem | 4,4 ^{abc} | 7,9 ^{ab} | 0,06 ^{efgh} |
| Chry | 5,7 ^{ab} | 8,8 ^{ab} | 0,08 ^{cdefg} |
| Esc | 2,5 ^{bc} | 5,5 ^{bc} | 0,04 ^{fgh} |

(-) não germinaram;

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

Tabela 4: Comprimento de raiz, altura da parte aérea, massa da matéria seca da raiz e parte aérea, com e sem a da bacterização da semente de limão cravo em solo autoclavado após 100 dias da incubação.

| Tratamentos | Altura | Comprimento | Massa da matéria seca | |
|-------------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | (cm) | (cm) | (g) | |
| | Parte aérea | raiz | raiz | Parte aérea |
| Testemunha | 3,84 ^a | 15,83 ^a | 0,21 ^b | 0,25 ^b |
| Bas | 6,64 ^a | 17,12 ^a | 0,27 ^{ab} | 0,27 ^b |
| Psp1 | 7,26 ^a | 18,78 ^a | 0,63 ^a | 0,78 ^a |
| Psp2 | 7,70 ^a | 15,87 ^a | 0,45 ^{ab} | 0,43 ^{ab} |
| Psp3 | 4,60 ^a | 17,35 ^a | 0,26 ^b | 0,27 ^b |
| Psf1 | 6,28 ^a | 17,70 ^a | 0,64 ^a | 0,78 ^a |
| Psf2 | 7,92 ^a | 16,84 ^a | 0,48 ^{ab} | 0,56 ^{ab} |
| Psf3 | 4,70 ^a | 15,60 ^a | 0,29 ^{ab} | 0,33 ^b |
| Psf4 | 6,45 ^a | 19,60 ^a | 0,38 ^{ab} | 0,47 ^{ab} |
| Psf5 | 7,05 ^a | 18,68 ^a | 0,46 ^{ab} | 0,54 ^{ab} |
| Pss | 6,23 ^a | 21,25 ^a | 0,45 ^{ab} | 0,56 ^{ab} |
| Pap1 | 6,53 ^a | 19,97 ^a | 0,47 ^{ab} | 0,44 ^{ab} |
| Pap2 | 6,14 ^a | 15,30 ^a | 0,23 ^b | 0,24 ^b |
| Fli | 5,26 ^a | 12,44 ^a | 0,14 ^b | 0,15 ^b |
| Sem | 6,28 ^a | 13,26 ^a | 0,20 ^b | 0,26 ^b |
| Chry | 6,55 ^a | 15,80 ^a | 0,27 ^{ab} | 0,37 ^{ab} |
| Esc | 5,00 ^a | 14,86 ^a | 0,21 ^b | 0,26 ^{ab} |

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%

Tabela 5: Comprimento de raiz, altura da parte aérea, massa da matéria seca da raiz e parte aérea, com e sem a bacterização da semente de limão cravo em substrato Plantmax® aos 100 dias de incubação.

| Tratamentos | Altura (cm) | Comprimento (cm) | Massa da matéria seca (mg) | |
|-------------|------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| | Parte aérea | Raiz | Parte aérea | Raiz |
| Testemunha | 4,8 ^a | 5,6 ^a | 0,0186 ^a | 0,0102 ^a |
| Bas | 5,3 ^a | 3,9 ^a | 0,0218 ^a | 0,0071 ^a |
| Psp1 | 5,8 ^a | 7,6 ^a | 0,0473 ^a | 0,0321 ^a |
| Psp2 | 5,2 ^a | 7,2 ^a | 0,0326 ^a | 0,0098 ^a |
| Psp3 | 5,4 ^a | 5,6 ^a | 0,0334 ^a | 0,0126 ^a |
| Psf1 | 6,2 ^a | 5,1 ^a | 0,0217 ^a | 0,0059 ^a |
| Psf2 | 5,3 ^a | 5,5 ^a | 0,0180 ^a | 0,0058 ^a |
| Psf3 | 5,1 ^a | 5,8 ^a | 0,0252 ^a | 0,0120 ^a |
| Psf4 | 4,4 ^a | 2,5 ^a | 0,0102 ^a | 0,0037 ^a |
| Psf5 | 6,0 ^a | 7,7 ^a | 0,0265 ^a | 0,0061 ^a |
| Pss | 5,3 ^a | 4,8 ^a | 0,0227 ^a | 0,0085 ^a |
| Pap1 | 4,7 ^a | 5,1 ^a | 0,0344 ^a | 0,0117 ^a |
| Pap2 | 6,5 ^a | 8,7 ^a | 0,0323 ^a | 0,0087 ^a |
| Fli | 5,3 ^a | 5,7 ^a | 0,0405 ^a | 0,0134 ^a |
| Sem | 6,3 ^a | 8,2 ^a | 0,0481 ^a | 0,0156 ^a |
| Chry | 4,0 ^a | 4,8 ^a | 0,0167 ^a | 0,0053 ^a |
| Esc | 3,9 ^a | 5,6 ^a | 0,0154 ^a | 0,0043 ^a |

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%

4.4. CONCLUSÕES

Os isolado Psf1 de *Pseudomonas fluorescens* e Psp1 de *P. putida* foram os mais eficientes em promover o crescimento das plântulas de citros nas diferentes condições testadas.

A solarização e o curto período experimental, aparentemente, beneficiaram os resultados proporcionando as maiores taxas de promoção de crescimento de citros pelos isolados rizobacterianos.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, E.P.R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros.** Botucatu, 1997. 111p. Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista (Unesp).

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ATLAS, R.M. Applicability to general ecological principles to microbial ecology. In: POINDEXTER, J.S.; LEADBETTER, E.R. **Bacteria in Nature**, Plenum Press, New York, p.339-361, 1986.

BALOTA, E.L.; KANASHIRO, M. A microbiologia do solo na cultura de citros. In: Revista Laranja, Revista técnico científico de citricultura, Cordeirópolis, v.19, n.1, p.167-183, 1998.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C.P. ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone level of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.793-800, 2001.

BROWN, M.E. Plant growth substance produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal Applied Bacteriology**, v.35, p.443-451, 1972.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.181-197, 1974.

ELLIOT, E.T.; COLEMAN, D.C.; INGHAM, R.E.; TROYFMOW, J.A. Carbon and energy flow through microplora and microfauna in the soil subsystem of terrestrial ecosystems. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current Perspectives in Microbial Ecology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.424-433, 1984.

GARDNER, J.M.; CHANDLER, J.L.; FELDMAN A.W. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonas on citrus roots. **Plant and Soil**, v.77, p.103-113, 1984.

- GHINI, R. A solar collector for soil desinfestation. **Netherland Journal of Plant Phatology**, Wageningen, v.99, p.45-50, 1993.
- KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. **Plant Diseases**, St. Paul, v.64, n.5, p.450-454, 1980.
- KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pest. **Annual Review of Phytopathology**, v.19, p.211-236, 1981.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v.71, p.642-644, 1981.
- LARKIN, R.P.; FRAVEL, D.R. Effects of varying environmental conditions on biological control of fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology**, v.92, n.11, p.1160-1166, 2002.
- LEFÈVRE, A.F.V.; SOUZA, N.L. Efeito da solarização sobre algumas variáveis do solo. **Summa Phytophatologica**, v.19, p.113-118, 1993
- LIFISHITZ, R. KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKIM, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TRIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.
- LUCON, C.M.M. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* e promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Piracicaba, 1992, 120p, Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- USP.
- LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICINI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 33-77, 1993.
- MELO, I.S.; VALARINI, P.J.; FAULL, J.I. Controle biológico de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.342, 1995.

SCHIPPERS, B. BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.339-358, 1987.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.453-476, 1981.

SINIGAGLIA, C.; PATRÍCIO, F.R.A.; GHINI, R.; MALAVOLTA, J.; TESSARIOLI, J.; FREITAS, S.S. Controle de *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani* e plantas daninha em alface pela solarização do solo e sua interação com controle químico. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.2, p.229-235, 2001.

SOUZA, N.L. Solarização do solo: revisão. **Summa Phytopathologica**, v.20, n.1, p. 3-15, 1994.

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phytophthora parasitica*
POR RIZOBACTÉRIAS EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phytophthora parasitica* POR RIZOBACTÉRIAS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

RESUMO

Para selecionar isolados rizobacterianos capazes de controlar a podridão de raízes causada por *Phytophthora parasitica*, quinze isolados rizobacterianos foi adicionado, individualmente e em algumas combinações, às raízes ou sementes de *Citrus limonia*. Os controles foram metalaxil, *Escherichia coli*, controle doente (somente com o patógeno) e testemunha sadia (sem microrganismos). No primeiro experimento, as raízes das plântulas com três meses de idade foram imersas em uma suspensão bacteriana e plantadas em substrato comercial Plantmax® autoclavado. No segundo, as sementes foram bacterizadas e, em seguida, colocadas para germinar em substrato Plantmax® (sem tratamento). Após 100 dias o substrato foi contaminado com *P. parasitica*. A presença do inóculo foi confirmada pelo teste da isca com folhas de citros. Em ambos experimentos, foram avaliados a altura da parte aérea, o peso da massa da matéria seca da raiz principal, radículas e parte aérea e, foram dadas notas à podridão apresentada nas raízes. No primeiro experimento não houve diferença significativa com relação a altura da parte aérea, entre os tratamentos. No segundo, houve diferença estatística na intensidade da podridão radicular. Os isolados de *Bacillus subtilis* (Bas), *Paenibacillus polymyxa* (Pap2) e *Pseudomonas fluorescens* (Psf1) se destacaram diminuindo a podridão radicular e controlando o patógeno.

Palavra chave: Biocontrole, *Citrus limonia*

BIOLOGICAL CONTROL OF *Phytophthora parasitica* BY RHIZOBACTERIA UNDER CONTROLLED CONDITIONS

ABSTRACT

In order to select rhizobacterial isolates capable of controlling the root rot caused by *Phytophthora parasitica*, fifteen rhizobacterial isolates were added, individually and in a few combinations, to the roots or seeds of *Citrus limonia*. The adopted controls were metalaxyl, *Escherichia coli*, diseased control (pathogen only) and healthy control (no microorganisms). In the first experiment, the roots of three-month old seedlings were immersed in a bacterial suspension and planted in autoclaved commercial substrate, Plantmax®. In the second, the seeds were bacterized and then placed to germinate in Plantmax® substrate (no treatment). After 100 days the substrate was contaminated with *P. parasitica*. The presence of inoculum was confirmed by the bait test with citrus leaves. In both experiments, evaluations included height of the aerial part of plants and dry matter mass weight in the main root, radicles and aerial part; in addition, ratings were attributed to the rot shown by the roots. In the first experiment there were no significant differences between treatments with regard to height of the aerial part. In the second, a statistical difference was found for root rot intensity. The *Bacillus subtilis* (Bas), *Paenibacillus polymyxa* (Pap2) and *Pseudomonas fluorescens* (Psf1) isolates were prominent in that they decreased root rot and controlled the pathogen.

Keywords: Biocontrol, *Citrus limonia*

5.1. INTRODUÇÃO

Diante dos constantes problemas ambientais advindos do uso indiscriminado e, às vezes abusivo de pesticidas, muitos pesquisadores têm desenvolvido métodos biológicos que asseguram um controle mais duradouro à saúde das plantas e menos nocivos ao ambiente. A demanda crescente por alimentos isentos de produtos químicos principalmente pesticidas tem destacado a importância do uso de agentes de controle biológico. Um dos passos para viabilizar este controle encontra-se em assegurar o estabelecimento dos antagonistas nos sítios de infecção do patógeno que se deseja controlar. Condições favoráveis aos antagonistas podem ser fornecidas mais facilmente em ambientes controlados, portanto permitindo uma vantagem competitiva com o patógeno, inicialmente, em casa de vegetação e, posteriormente, nos pomares.

Mas, o controle químico com uso de fungicidas sintéticos ainda é o método mais utilizado globalmente. A facilidade de obtenção desses produtos e os resultados fitossanitários imediatos fazem dele o método mais difundido na citricultura. O uso cada vez mais freqüente de fungicidas sintéticos tem promovido a seleção de fungos resistentes, levando a perda de eficiência e falha no controle do patógeno. A resistência de microrganismos a produtos químicos tem sido um grande problema para o controle de diversas doenças (GHINI; KIMATI, 2000).

Pelos motivos apresentados acima, entre outros, o controle com fungicidas têm sido dificultado por motivos econômicos e ambientais. Entretanto, patógenos de solo são responsáveis por danos econômicos em muitas culturas importantes, sendo considerado um dos fatores limitantes para a saúde das plantas e para a produção em termos qualitativos e quantitativos.

Uma alternativa que está sendo bastante testada para esses problemas é o tratamento do substrato ou solo com bactérias benéficas, tais como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, por meio da microbiolização de sementes (LUZ, 1993) como forma de aumentar a competitividade destes microrganismos benéficos quando transplantados para o campo. Entretanto, uma grande variedade de fatores está envolvido na ineficácia de rizobactérias como agente de biocontrole, como a complexa interação entre a planta hospedeira, patógenos, antagonista e ambiente. Para o sucesso desse processo o agente de

biocontrole deverá ser capaz de, rapidamente, multiplicar-se na presença de fungicidas e de competir com outros organismos na espermosfera e rizosfera (BUCHENAUER, 1998).

A bacterização de sementes e/ou raízes para o controle de patógenos de solo pode consistir uma opção estratégica para o controle de fitopatógenos, bem como para diminuir os problemas ambientais decorrentes do uso de produtos químicos no ambiente (LUZ, 1993). O objetivo desse trabalho foi testar bactérias da rizosfera antagônicas no controle de *Phytophthora parasitica* em *Citrus limonia*, através da bacterização de sementes ou raízes.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Isolamento e seleção de antagonista

O isolamento das bactérias do solo foi feito mediante diluição seriada e plaqueamento em meios seletivos de amostras de solo coletadas de solo supressivo à *Phytophthora*. Foram preparadas diluições com 10 g de solo rizosférico de citros, e adicionados 90 mL de água destilada esterilizada, agitada por 15 minutos, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir, 1 mL dessa solução foi adicionada a 9 mL de água destilada para obter uma diluição 10^{-2} , e o processo foi repetido até as diluições 10^{-5} e 10^{-6} . Para o isolamento dos microrganismos, 100 μ L das três últimas diluições foram semeadas sobre o meio de cultura e homogeneizado com auxílio de alça de Drigalsky, previamente desinfestada em álcool 95° e flambada. Para o isolamento das bactérias foi empregado o meio de cultura Nutriente ágar (NA, Oxoid, 28 g L⁻¹) e King B (Proteose-peptona 03 Difco, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, glicerol, pH 7,2). Foram feitas três repetições para cada meio – diluição, e as placas foram mantidas a 25° C até o crescimento das colônias bacterianas.

Para a seleção de antagonistas, as placas com as colônias bacterianas foram pulverizadas com suspensão dos esporos do patógeno e incubadas por alguns dias, até a formação de halos de inibição em torno de algumas colônias. Os isolados dessas colônias foram repicados para os meios NA e KB e após o seu crescimento foram transferidos para frascos com meio de cultura inclinado e incorporados à coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente.

5.2.2. Microrganismos utilizados nos ensaios e métodos de preservação

Foram utilizadas quinze linhagens de rizobactérias, isoladas da rizosfera de citros, uma do rizoplano de feijoeiro (OG) e uma de cenoura (Santa Bárbara) e três isolados de citros pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, contra *Phytophthora parasitica* IAC 01/95 do Centro APTACSM. Foi incluída *Escherichia coli* como controle negativo (TABELA 1).

Estas bactérias foram testadas quanto à capacidade de controlar a podridão de raízes causada por *Phytophthora parasitica*. As bactérias foram mantidas em frascos contendo

meio NA inclinado sob óleo mineral Nujol, durante o período experimental. O isolado do patógeno foi mantido em água destilada esterilizada em temperatura ambiente na ausência de luz.

Tabela 1. Isolados bacterianos testados, sua identificação e a cultura de onde foram isolados.

| CÓDIGO ¹ | ESPÉCIES | ISOLADOS | HOSPEDEIRO |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------|
| Bas | <i>Bacillus subtilis</i> | OG* | Feijoeiro |
| Psp1 | <i>Pseudomonas. putida</i> | Sta. Bárbara* | Cenoura |
| Psp2 | <i>P. putida</i> | C1-1B* | Citros |
| Psp3 | <i>P. putida</i> | 1-4 | Citros |
| Psf1 | <i>P. fluorescens</i> | C ₁ -S/Na* | Citros |
| Psf2 | <i>P. fluorescens</i> | C ₂ -8C* | Citros |
| Psf3 | <i>P. fluorescens</i> | 6-5 ₂ | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 3-6 | Citros |
| Psf4 | <i>P. fluorescens</i> | 2-3 _{1A} | Citros |
| Pss | <i>P. syringae</i> | 2-6 | Citros |
| Pap1 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 6-5 ₁ | Citros |
| Pap2 | <i>P. polymyxa</i> | 3-4 | Citros |
| Fli | <i>Flavobacterium indologenes</i> | 6-5 ₃ | Citros |
| Sem | <i>Serratia marcescens</i> | R3-5 | Citros |
| Chry | <i>Chryseobacterium</i> sp | 2-3 _{1L} | Citros |
| Esc | <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | Comercial |

* pertencem ao Banco de Recursos Genéticos da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

1. código de identificação

5.2.3. Teste de Patogenicidade

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar o potencial do isolado de *P. parasitica* em causar doença em frutos de citros. Micélios do patógeno, crescidos em meio CA, com 7 dias de idade foram inoculados em frutos de limão cravo. Inicialmente, os frutos foram lavados com hipoclorito de sódio 2% e uma solução de benomil (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, com uma agulha esterilizada, micélios do patógeno foram inoculados nos furos feitos nos frutos e cobertos com esparadrapo. Estes foram incubados em câmara úmidos por um período de 7 a 10 dias. A presença de coloração e odor característico da podridão-parda de frutos (FEICHTENBERGER, 2001) confirmou a eficiência do patógeno em causar à doença. Gomos contaminados foram colocados em meio CA com benomil (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rifampicina (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o reisolamento do patógeno. Este

teste foi realizado anualmente para confirmar a patogenicidade do isolado IAC-01/95, durante o período experimental.

5.2.4. Produção de inóculo de *Phytophthora parasitica*

O inóculo do patógeno foi produzido em grãos de trigo autoclavados, em sacos de polipropileno, acrescidos de discos de meio de cultura CA com crescimento micelial de *P. parasitica* (McGovern et al., 2000, modificado).

Uma descrição breve do método: o substrato, 250g de grãos de trigo e 100mL de água destilada, foi colocado em sacos de polipropileno (15 x 20cm), autoclavado a 121°C, por 40 minutos. Após autoclavagem foram acrescentados ao substrato mais 50mL de água destilada e fechados hermeticamente com auxílio de uma seladora e novamente autoclavados por mais 20 minutos, a 121°C. A seguir, sob condições assépticas, cada saco contendo o substrato recebeu 15 discos de 5mm de diâmetro de meio de cultura (CA – cenoura-ágar 200g mL⁻¹) contendo micélio do patógeno. Discos esses que foram retirados das bordas de uma colônia com sete dias de idade. Em seguida, as culturas foram mantidas em câmara de incubação a 25°C.

5.2.5. Bacterização das Sementes e Raízes

Sementes de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (5min), hipoclorito de sódio 2% + tween (20min), seguido de lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. A última água de lavagem foi semeada em meio nutriente ágar (NA) e as placas incubadas para observação de contaminantes. As bactérias foram crescidas separadamente em tubos de ensaio com meio NA inclinados a 27°C por 48 horas. Após este período foi adicionada solução salina (0,85%) esterilizada, seguindo agitação e a transferência da suspensão de células bacterianas para outro tubo. As sementes desinfestadas foram imersas nas suspensões rizobacterianas (concentrações de 10⁸ bactérias mL⁻¹ pela escala de McFarland) e incubadas por 2 horas. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina (0,85%) esterilizada. As raízes foram bacterizadas de forma semelhante às sementes.

5.2.6. Experimento 1

Este experimento foi conduzido em telado, em substrato comercial Plantmax®. O substrato foi esterilizado por autoclavagem por 40 minutos a 121°C. As raízes das plântulas com 3 meses foram imersas na suspensão bacteriana por 12 horas, em seguida, transferidas para o substrato tratado com o inóculo do patógeno. Foram feitos os seguintes tratamentos: 1) isolados bacterianos individualmente; 2) mistura 1 (rizobactérias: Bas + Sem); 3) mistura 2 (rizobactérias: Bas + Pap2); 3) metalaxil [Ridomil® 50 Gr (0,7 mg/400g de substrato)]; 4) controle (com o patógeno); 5) testemunha (sem o patógeno). O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, com 4 repetições.

Os parâmetros avaliados foram: altura da parte aérea, peso seco das radículas e raiz principal e podridão radicular. A podridão radicular foi classificada pela seguinte escala de notas: 0, sem podridão; 1, 1-10 ; 2, 11-25; 3, 26-50 e 4, > 50 podridões por sistema radicular. A constatação da presença do patógeno foi feita através do método de isca com pedaços de folhas de citros flutuando em mistura de solo + água (GRIMM; ALEXANDER, 1973). Foram avaliadas todas as plantas germinadas por vaso e a medida das plantas de cada unidade experimental foi considerada uma repetição.

5.2.7. Experimento 2

As sementes foram imersas por 2 hora na suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹ medido pela escala de McFarland), e germinadas em substrato Plantmax® sem esterilização (natural). Os tratamentos foram com os isolados bacterianos, fungicida metalaxil, controle (com o patógeno), testemunha (sem o patógeno) e *E. coli* como controle negativo. A temperatura ambiente foi em torno de 25°C, com umidade em torno de 80%. Foram adicionadas 4 sementes por parcela com quatro repetições. O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, com 4 repetições

A avaliação foi realizada de forma similar ao experimento anterior.

5.2.8. Teste de isca para confirmação da presença do patógeno

Nos dois ensaios acima, para verificar a presença do patógeno, foi feita a técnica de isca com folhas de citros visando confirmar a presença do patógeno, técnica modificada a

partir de Grimm & Alexander (1973). Em placas de Petri, previamente desinfestadas com álcool 70°, foram colocados 5g do substrato utilizado no experimento, 30mL de água destilada e 10 fragmentos de folhas de citros de 6mm.

As folhas de citros empregadas no teste foram obtidas de plantas de limão cravo que não tinham recebido nenhum tratamento químico, e foram desinfestadas com álcool 70°C por 1 minuto. As placas foram mantidas à temperatura ambiente, em luz constante, por 7 dias, quando realizou-se a avaliação das iscas. Para isto, as iscas foram transferidas para lâminas com uma gota de azul de metileno e cobertas com lamínulas, e observadas no microscópio óptico com lente de imersão. Os resultados foram descritos como positivos quando, pelo menos, um esporângio estava presente na folha.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Experimento 1

A aplicação de rizobactérias demonstrou um efeito positivo no aumento da biomassa da matéria seca da parte aérea e radicular. No entanto não foram detectadas diferenças estatísticas quanto à altura da parte aérea e ao peso das radículas (TABELA 2). Também se verificou que a inoculação de algumas bactérias diminuiu a podridão radicular, sobressaindo-se às bactérias Bas, Psf2, Pap2 e Sem.

A massa da matéria seca da parte aérea do isolado Fli diferiu negativamente em relação a testemunha (sadia). As plantas tratadas com os isolados Chry, Psf4, Psf5, Fli, Esc e as misturas obtiveram as maiores incidências de podridões e não diferiram estatisticamente do controle (doente). A Figura 1 mostra as diferenças na intensidade da doença variando entre alguns dos isolados testados. Pode-se observar que algumas plântulas tiveram a parte mediana praticamente sem radículas e com uma coloração típica do apodrecimento da raiz principal; em outros casos o sintoma ainda permanecia nas pontas das radículas.

As combinações dos isolados utilizados neste experimento não controlaram a podridão de raízes causada por *P. parasitica*, mas quando usados isoladamente foram eficientes. Muitos são os fatores que podem alterar positiva ou negativamente uma associação entre antagonistas. A mistura de isolados, comparada ao uso de um só antagonista, pode resultar em uma comunidade na rizosfera mais estável, ampliando a diversidade de mecanismos de controle biológico, podendo suprimir vários patógenos (PIERSON; WELLER, 1994). Alguns pesquisadores observaram que a utilização da combinação de diferentes isolados de *Pseudomonas fluorescens* foi mais eficiente em controlar *Rhizoctonia solani*, em arroz, do que a aplicação deles de forma isolada (NANDAKUMAR et al. 2001), não concordando com o observado nesse experimento. Mas Hubbard et al. (1983) alerta que a incompatibilidade entre isolados existe, o que pode explicar a falta de eficiência dos isolados quando aplicados em conjunto.

Tabela 2: Experimento com raízes bacterizadas. Altura da parte aérea, massa da matéria seca da raiz e parte aérea, tratamentos com e sem o patógeno, em substrato autoclavado após 100 dias de incubação.

| Tratamentos | Altura (cm) | | Nota | | | Massa da matéria seca (g) | | |
|------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------------|--|--|
| | Parte aérea | Podridão* | Parte aérea | Raiz principal | Radicelas | | | |
| Controle doente ¹ | 25,3 ^a | 4 ^a | 2,0 ^{ab} | 0,30 ^{abc} | 0,4 ^a | | | |
| Test.. sadia ² | 40,5 ^a | 1 ^c | 2,9 ^a | 0,50 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Bas | 30,0 ^a | 1 ^c | 1,8 ^{ab} | 0,37 ^{bc} | 0,5 ^a | | | |
| Psp1 | 35,5 ^a | 3 ^{abc} | 2,1 ^{ab} | 0,45 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Psp2 | 34,6 ^a | 3 ^{abc} | 2,0 ^{ab} | 0,47 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Psp3 | 32,0 ^a | 3 ^{abc} | 1,9 ^{ab} | 0,50 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Psf1 | 35,5 ^a | 3 ^{abc} | 2,3 ^{ab} | 0,45 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Psf2 | 27,6 ^a | 2 ^{bc} | 1,8 ^{ab} | 0,45 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Psf3 | 34,3 ^a | 3 ^{abc} | 2,2 ^{ab} | 0,42 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Psf4 | 32,6 ^a | 4 ^a | 2,2 ^{ab} | 0,40 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Psf5 | 32,6 ^a | 4 ^{ab} | 1,7 ^{ab} | 0,42 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Pss | 30,3 ^a | 3 ^{abc} | 1,8 ^{ab} | 0,50 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Pap1 | 38,0 ^a | 3 ^{abc} | 2,4 ^{ab} | 0,35 ^c | 0,4 ^a | | | |
| Pap2 | 29,7 ^a | 1 ^c | 2,1 ^{ab} | 0,52 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Fli | 29,6 ^a | 4 ^a | 1,6 ^b | 0,47 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Sem | 35,0 ^a | 2 ^{bc} | 2,3 ^{ab} | 0,52 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Chry | 32,4 ^a | 4 ^a | 1,9 ^{ab} | 0,65 ^a | 0,6 ^a | | | |
| Esc | 32,5 ^a | 4 ^a | 2,0 ^{ab} | 0,50 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Mist 1** | 36,0 ^a | 4 ^a | 2,5 ^{ab} | 0,52 ^{abc} | 0,6 ^a | | | |
| Mist 2** | 31,6 ^a | 4 ^a | 1,9 ^{ab} | 0,42 ^{abc} | 0,5 ^a | | | |
| Metalaxil | 36,6 ^a | 2 ^{bc} | 2,7 ^{ab} | 0,62 ^{ab} | 0,6 ^a | | | |

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%

* notas: 0 (sem podridão); 1 (1-10); 2 (11-25); 3 (26-50); 4 (> 50 podridões/sistema radicular)

** mistura 1 (Bas+Sem); mistura 2 (Bas+Pap2)

1- controle doente (tratamento somente com o patógeno)

2- testemunha sadia (sem adição de microrganismos)

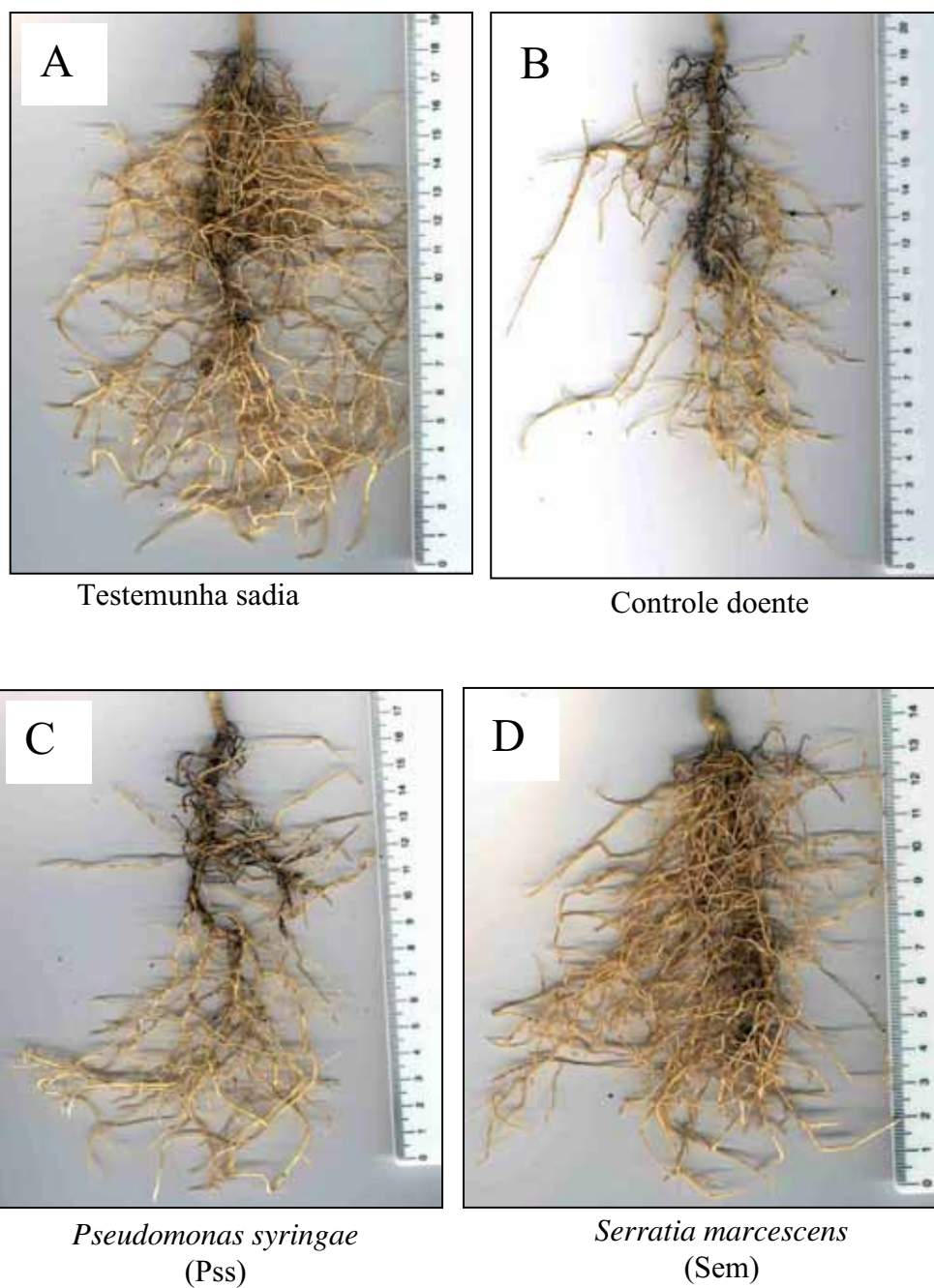


Figura 1. Raízes de limoeiro cravo tratadas com isolados bacterianos, em solo autoclavado com e sem a presença de *Phytophthora parasitica*, após 100 dias de incubação. (A) Testemunha sadia (sem o patógeno); (B) Controle doente (apenas com o patógeno); (C) *P. syringae* (Pss); (D) *S. marcescens* (Sem).

5.3.2. Experimento 2

As sementes tratadas com as rizobactérias diferiram significativamente na intensidade da podridão radicular, embora não tenha diferido estatisticamente dos outros parâmetros avaliados (TABELA 3). Os isolados Psf1 e Pap2 não diferiram estatisticamente da testemunha (sadia) e obtiveram os menores níveis de severidade da doença. Amorim & Melo (1999; 2002) trabalhando com o isolado Psf1 (C1/SNa) também constataram o controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora* em citros após a bacterização das sementes. Estes resultados indicam que esse isolado bacteriano tem potencial de competir e permanecer na rizosfera de citros. Entretanto, estes autores observaram que, além do isolado citado acima (C1/SNa), o isolado C1-1B (Psp2) e o C2-8C (Psf2) também controlaram os patógenos, discordando dos resultados obtidos no presente trabalho, cujo níveis de severidade da doença foram três (3) e quatro (4), respectivamente, após a aplicação destes isolados (TABELA 3).

A ineficiência de muitos isolados no controle biológico em solos pode ter como causa diferentes fatores como: falha do agente de biocontrole em se estabelecer na semente ou rizosfera, competição por espaço e nutrientes, ineficiência na colonização, instabilidade na manutenção da densidade inicial, inabilidade de competir com os microrganismos nativos, deficiência na formulação ou até mesmo a perda da eficiência através de mutações, devido a sucessivas repicagens ou durante o armazenamento (LUZ, 1993). Este mesmo autor descreve que o estágio de desenvolvimento da planta também pode influir na eficiência do controle microbiológico. Alguns desses fatores podem ser a causa da incapacidade de alguns isolados em suprimir o patógeno neste experimento.

Yang et al. (1993) verificaram que um isolado de *P. fluorescens* sobreviveu bem em solo autoclavado, mas não em solo sem esterilização. Entretanto, existem casos como o do isolado de *P. fluorescens* que foi antagonista a *Gaeumannomyces graminis*, cujas sementes de trigo foram bacterizadas e semeadas em solo não esterilizado (WELLER; COOK, 1983).

Tabela 3: Experimento com sementes bacterizadas. Altura da parte aérea, massa da matéria seca da raiz e parte aérea, com e sem o patógeno, em substrato não esterilizado após 100 dias de incubação.

| Tratamentos | Altura (cm) | | Nota* | | Massa da matéria seca (g) | |
|------------------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|------|
| | Parte aérea | Podridão | Parte aérea | Raiz | Parte aérea | Raiz |
| Controle doente ¹ | 3,4 | 4 ^a | 0,0161 ^a | 0,0070 ^a | | |
| Test. Sadia ² | 5,0 ^a | 1 ^c | 0,0201 ^a | 0,0104 ^a | | |
| Bas | 4,8 ^a | 2 ^{bc} | 0,0206 ^a | 0,0083 ^a | | |
| Psp1 | 6,1 ^a | 2 ^{bc} | 0,0295 ^a | 0,0105 ^a | | |
| Psp2 | 5,5 ^a | 3 ^{abc} | 0,0273 ^a | 0,0103 ^a | | |
| Psp3 | 4,9 ^a | 3 ^{ab} | 0,0409 ^a | 0,0151 ^a | | |
| Psf1 | 4,7 ^a | 1 ^c | 0,0306 ^a | 0,0096 ^a | | |
| Psf2 | 4,6 ^a | 4 ^a | 0,0253 ^a | 0,0103 ^a | | |
| Psf3 | 4,8 ^a | 4 ^a | 0,0273 ^a | 0,0133 ^a | | |
| Psf4 | 5,1 ^a | 4 ^a | 0,0216 ^a | 0,0075 ^a | | |
| Psf5 | 4,6 ^a | 3 ^{abc} | 0,0313 ^a | 0,0096 ^a | | |
| Pss | 4,3 ^a | 3 ^{abc} | 0,0257 ^a | 0,0091 ^a | | |
| Pap1 | 4,3 ^a | 3 ^{abc} | 0,0269 ^a | 0,0119 ^a | | |
| Pap2 | 3,3 ^a | 1 ^c | 0,0274 ^a | 0,0127 ^a | | |
| Fli | 4,2 ^a | 3 ^{abc} | 0,0267 ^a | 0,0097 ^a | | |
| Sem | 4,1 ^a | 2 ^{bc} | 0,0273 ^a | 0,0154 ^a | | |
| Chry | 4,9 ^a | 3 ^{abc} | 0,0260 ^a | 0,0124 ^a | | |
| Esc | 4,1 ^a | 4 ^a | 0,0204 ^a | 0,0114 ^a | | |
| Metalaxil | 5,8 ^a | 2 ^{bc} | 0,0232 ^a | 0,0096 ^a | | |

Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%

* notas: 0 (sem podridão); 1 (1-10); 2 (11-25); 3 (26-50); 4 (> 50 podridões/sistema radicular)

1- controle doente (tratamento somente com o patógeno)

2- testemunha sadia (sem adição de microrganismos)

Muitos trabalhos relatam bactérias controlando a podridão radicular causado por *P. parasitica* (STEDDOM et al. 2002; AMORIM; MELO, 2002; GARDNER et al., 1984). Turney & Menge (1993) isolaram um isolado de *Pseudomonas putida*, que efetivamente reduziu, em casa de vegetação e em câmara de germinação, a população tanto de *P. parasitica* como *P. citrophthora*, agentes causais da podridão de raízes de citros, concordando com os resultados obtidos, onde os isolados de *Pseudomonas putida* (Psf2 e Psf1) controlaram *P. parasitica* em plântulas de limão cravo

O isolado de *Bacillus subtilis* também teve um bom desempenho no controle de *P. parasitica*, quando as raízes ou as sementes foram tratadas. O sucesso no controle de *Fusarium* sp e *Rhizoctonia* sp obtido com a utilização de *Bacillus subtilis*, cuja eficácia deveu-se principalmente, a facilidade na sua formulação e na estocagem do produto

(TURNER; BACKMAN, 1991). Este bactéria também protegeu plântulas de soja do tombamento, sob diferentes condições de campo (OSBURN et al., 1995).

5.3.3. Teste da isca para confirmação da presença do patógeno

Foi baixa a recuperação do patógeno na maioria dos tratamentos, concordando com os resultados obtidos por Velazco (2002). Isto poderia ser explicado pelo tipo substrato utilizado na produção de inóculo do patógeno que, segundo esse autor; quando incorporados ao solo podem ser degradados levando à produção de substâncias tóxicas à *P. parasitica*, ou seja, prejudicando a sua sobrevivência, ou os antagonistas foram capazes de inibir eficientemente o patógeno no solo, ou seja, controlaram o patógeno.

5.4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que os isolados de *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens* (Psf2), *Paenibacillus polymyxa* (Pap2) e *Serratia marcescens* controlaram o patógeno quando as raízes foram tratadas, enquanto que, *B. subtilis*, *P. fluorescens* (Psf1), *P. putida* (Psp1), *P. polymyxa* (Pap2) e *S. marcescens*, quando o tratamento foi nas sementes. Uma maior quantidade de isolados controlaram o patógeno quando o tratamento foi aplicado nas sementes, indicando ser o melhor local de aplicação das rizobactérias.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, E.P.R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros.** Botucatu, 1997. 111p. Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista (Unesp).

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em plântulas de citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.4, p.335-338. 1999.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne disease by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.104, n.4, p. 329-348, 1998.

ELLIOT, E.T.; COLEMAN, D.C.; INGHAM, R.E.; TROYFMOW, J.A. Carbon and energy flow through microplora and microfauna in the soil subsystem of terrestrial ecosystems. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current Perspectives in Microbial Ecology.** American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.424-433, 1984.

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros. São Paulo: Rodhia Agro, 1996, 42p.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.2, p. 261-296.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, 2001, cap. 9, p. 283-342.

GARDNER, J.M.; CHANDLER, J.L.; FELDMAN A.W. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonas on citrus roots. **Plant and Soil**, v.77, p.103-113, 1984.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, 78p.

GRIMM, G.R.; ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. **Phytopathology**, St.Paul, v.63, p.540-541, 1973.

HUBBARD, J. P.; HARMAN, G.E.; HADAR, Y. Effects of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, v.73, p.655-659, 1983.

JUAREZ-PALACIOS, C.; FELIX-GASTELUM, R.; WAKEMAN, R.J.; PAPLOMATAS, E.J.; DeVAY, J.E. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. **Plant Disease**, v.75, n.11, p.1160-1164, 1986.

KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pest. **Annual Review of Phytopathology**, v.19, p.211-236, 1981.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v.71, p.642-644, 1981.

LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. IN: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 33-77, 1993.

MALAJCZUK, N. Microbial antagonism to *Phytophthora*. IN: ERWIN, D.C. **Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983, p.197-218.

McGOVERN, R.J.; McSORLEY, R.; URS, R.R. Reduction of *Phytophthora* blight of Madagascar periwinkle in Florida by soil solarization in autumn. **Plant Disease**, v.84, n.2, p.185-191, 2000.

MELO, I.S.; VALARINI, P.J.; FAULL, J.I. Controle biológico de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.342, 1995.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; SHEELA, J.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. A new bio-formulation containing plant growth promoting

rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. **Biocontrol**, v.46, p.493-510, 2001.

OSBURN, R.M.; MILNER, J.L.; OPLINGER, E.S.; SMITH, R.S.; HANDELSMAN, J. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. **Plant Disease**, v.79, p.551-556, 1995.

PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixture of fluorescent pseudomonas to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.2, p.940-947, 1994.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.453-476, 1981.

STEDDOM, K.; MENGE, J.A.; CROWLEY, D.; BORNEMAN, J. Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* 06090-rif/nal on citrus soil microbial communities. **Phytopathology**, v.92, n.8, 2002.

TURNEY, J.K.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Diseases**, v.75, p.347-353, 1991.

TURNEY, J.K.; MENDER, J.A. Biocontrol of *Phytophthora citrophthora* root rot of citrus. (abstract), v.83, p. 1348, 1993.

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A.; MENZIES, J.G. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.21, p.265-271, 1999.

VELAZCO, C.L. Indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo com lodo de esgoto. Piracicaba, 2002, 66p, Dissertação Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ/USP.

WELLER, D.M.; COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonas. **Phytopathology**, v.68, p.1656-1661, 1983.

YANG, G.Y. MENGE, J.A.; COOKSEY, D.A. Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.580-584, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É indiscutível a potencialidade do uso de rizobactérias no controle de patógenos, na promoção de crescimento e no aumento de produção, evidenciado pela quantidade de trabalhos publicados na literatura. Entretanto, sua utilização comercial ainda é pequena e com resultados variáveis. Desde a seleção até sua formulação é necessária uma padronização da metodologia, primeiro para conhecer o(s) microrganismo(s); quanto ao seu potencial em colonizar as raízes da planta hospedeira, bem como quanto à sua capacidade de sobreviver e se estabelecer na rizosfera. Além disso, é necessário conhecer seus mecanismos de ação e as muitas variáveis ambientais que interferem direta ou indiretamente para o estabelecimento do biofungicida.

A citricultura, pela importância que representa para a economia, não só no Brasil como no mundo, tem sido afetada por importantes fitopatógenos de solo, dentre eles *Phytophthora* o agente causal da gomose.

Nesse trabalho, foi proposto o uso de rizobactérias capazes de colonizar o sistema radicular de citros no controle de *P. parasitica*. Para isso, selecionou-se um método rápido para visualização da colonização radicular e que, com baixos custos e tempo poderia ajudar na procura de agentes de biocontrole. Os resultados observados demonstram o potencial de algumas linhagens, principalmente, *Pseudomonas putida* (Psp1), *P. fluorescens* (Psf3) e *Chryseobacterium* (Chry) em colonizar o sistema radicular de limoeiro cravo.

Sabe-se que os testes de antagonismo em meio de cultura são bastante questionáveis em relação à real potencialidade daquele isolado em efetivamente promover algum benefício ao cultivar. Entretanto, o(s) mecanismo(s) utilizado(s) pelo isolado bacteriano ao patógeno é identificado pelos testes *in vitro*, os quais promovem um melhor planejamento da estratégia de manejo do antagonista, inclusive no que diz respeito a utilização de mais de um isolado para os ensaios *in vivo*.

A utilização de diferentes meios com o intuito de selecionar isolados que promovam a inibição do patógeno é interessante pelo fato de permitir o conhecimento do potencial, qualitativo e quantitativo de linhagens de interesse. No entanto, as metodologias utilizadas para avaliar a inibição não podem servir de parâmetro em outros ensaios, isto por falta de um referencial estável. Assim, o uso de um produto

químico que controle o patógeno proporciona a quantificação numérica da inibição em testes de antagonismo. Isto ficou demonstrado quando o isolado de *Paenibacillus polymyxa* produziu um potente antibiótico, inibindo o patógeno na mesma intensidade do fungicida, mesmo em meio de cultura cenoura-ágar, rico em nutrientes, e desta forma, capaz de favorecer o crescimento do patógeno.

Da mesma forma, os testes *in vivo* devem abranger diversas condições ambientais, desde variações na temperatura até uma limitada disponibilidade de nutrientes. Alguns trabalhos abordam a eficiência de rizobactérias em promover o crescimento e/ou controlar o fitopatógeno sob determinadas condições. A importância em se conhecer as melhores condições para aumentar a eficiência do antagonista é um fator extremamente importante para o êxito do biocontrole. Os isolados de *Bacillus subtilis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa* e *Serratia marcescens* controlaram o patógeno quando as raízes ou sementes foram tratadas, nas condições experimentais deste trabalho. O isolado de *Serratia marcescens* parasitou o micélio do *P. parasitica* que foi facilmente acompanhado devido ao pigmento produzido pela rizobactéria. Esta característica é interessante pela capacidade de crescer por todo o micélio do patógeno, colonizando-o totalmente, e matando-o em um curto período de tempo. São necessários mais estudos para identificação deste “antibiótico” e de um maior conhecimento do metabólito (pigmento rosea) associado à inviabilidade micelial do patógeno, e ao mesmo tempo ter um melhor conhecimento do parasitismo existente.

A nova legislação da Certificação de mudas cítricas para a produção de mudas saudáveis é um grande avanço para a prevenção da infestação das plântulas em viveiros. Entretanto, apesar de saudáveis, estas mudas serão transplantadas para solos que, muitas vezes, podem conter o patógeno em quantidades significativas, além do fato de que plantas novas possuem um metabolismo mais ativo, podendo atrair o fitopatógeno. Desta forma, a produção de isolados que aumentem a vitalidade das plantas e as protejam-nas de microrganismos deletérios é uma estratégia bastante atrativa para a fase de produção de mudas nos pomares. Técnicas tais como a utilização de solo solarizado com as sementes bacterizadas tem mostrado melhores condições para a promoção do crescimento de limoeiro (*Citrus limonia*), principalmente pelos isolados de *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Serratia*

Maiores informações serão ainda necessárias para a compreensão de interações entre os agentes de biocontrole e as plantas hospedeiras, no sentido do desenvolvimento de estratégias de manipulação das características do antagonista, para desta forma, potencializar o efeito da rizobactéria sobre o patógeno. A padronização das metodologias, bem como a possibilidade de repetibilidade dos experimentos já realizados, poderá beneficiar uma ação integrada na busca de soluções para amenizar os danos causados pelos fitopatógenos tanto em citros como outras culturas de interesse mundial.