



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

EFEITO DA APLICAÇÃO DE FITORREGULADORES EM RIZOBACTÉRIAS  
ISOLADAS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*),  
NO MUNICÍPIO DE ARARAS-SP

SILVANA PERISSATTO MENEGHIN

Março - 2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

EFEITO DA APLICAÇÃO DE FITORREGULADORES EM RIZOBACTÉRIAS  
ISOLADAS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*),  
NO MUNICÍPIO DE ARARAS-SP

SILVANA PERISSATTO MENEGHIN

Orientadora: Dra. SÂMIA MARIA TAUK-TORNISIELO (CEA – UNESP/Rio Claro-SP)

Tese apresentada ao Instituto de  
Bióciências do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).

Março - 2008

***Dedico***

*este trabalho às pessoas que mais amo, meus pais Cecília e Waldomiro, e  
aos meus queridos Eduardo e Guto. Sem vocês nada faz sentido...*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Carlos pelo amparo institucional, e ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (UFSCar) pelo suporte financeiro que possibilitou a obtenção do título.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo, pela amizade, confiança e orientação durante estes anos.

À colega, amiga e irmã, Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar), pelo apoio, incentivo e também pelas oportunidades de enriquecimento profissional que me proporcionou.

À Lúcia Terezinha Picollo Silva, técnica do LAMAM (UFSCar), à minha orientada Fernanda Domingues, e ao Cláudio José Mendes, técnico do DBV (UFSCar), pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

A Márcia Maria Rosa, minha aluna, orientada, colega do curso de pós-graduação em Microbiologia Aplicada e hoje minha afilhada, pelos bons momentos e dificuldades compartilhados durante estes anos.

Aos alunos e amigos do LAMAM, Fabrícia, Mônica, Thiago, Simoni, Cárol, Viviane, Babi, Cristina, Afra, Paula, Heloisa, Emanuele, Guilherme, Pedro, Vanda, Ana Paula, Greice, Vanessa, Valéria, Diogo e Christiann, que torceram pela conclusão deste trabalho.

Ao diretor do Centro de Ciências Agrárias (UFSCar), Prof. Dr. Norberto Antonio Lavorenti, e à Profa. Dra. Maria Lúcia Scatenna, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos Dr. Sizuo Matsuoka (Canavialis) e Profa. Dra. Regina Tereza Rosim Monteiro (CENA-USP), pelas correções e sugestões.

À Sara Cristina Galvão (CEA-UNESP), pela colaboração em todas as horas.

À Deus, por colocar estas pessoas maravilhosas no meu caminho.....*Muito obrigada!*

## ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. Rizobactérias.....	04
2.2. Fitorregulador ou regulador vegetal.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Fitorreguladores utilizados.....	14
3.2. Variedades de cana-de-açúcar.....	14
3.3. Meios de cultura e soluções.....	15
3.4. Efeito da adição de fitorreguladores sobre a comunidade microbiana do solo.....	18
3.5. Experimentos em casa-de-vegetação.....	19
3.5.1. Caracterização do solo.....	19
3.5.2. Preparo das mudas.....	20
3.5.3. Avaliação do efeito residual em mudas de cana-de-açúcar dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.....	20
3.5.4. Avaliação da aplicação via solo dos fitorreguladores Ethrel e Moddus no desenvolvimento de cana-de-açúcar.....	22
3.6. Isolamento de rizobactérias de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores.....	23
3.7. Antagonismo <i>in vitro</i> entre fungos fitopatogênicos e rizobactérias.....	24
3.8. Teste de promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação.....	25
3.9. Antagonismo <i>in vivo</i> de isolados de rizobactérias contra <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	26
3.10. Estudo dos mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento.....	27
3.10.1. Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA).....	27

3.10.2.	Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico.....	27
3.10.3.	Seleção de bactérias produtoras de ácido cianídrico (HCN).....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1.	Efeito da adição de fitorreguladores sobre a comunidade microbiana do solo.....	29
4.2.	Avaliação do efeito de fitorreguladores em cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação.....	37
4.2.1.	Efeito residual da aplicação de fitorreguladores via foliar.....	37
4.2.2.	Aplicação de fitorreguladores via solo.....	45
4.3.	Isolamento de rizobactérias de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores.....	51
4.4.	Antagonismo <i>in vitro</i> entre fungos fitopatogênicos e rizobactérias.....	55
4.5.	Teste de promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação.....	62
4.6.	Antagonismo <i>in vivo</i> de isolados de rizobactérias contra <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	66
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
6.	CONCLUSÕES.....	72
7.	LITERATURA CITADA.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de fungos do solo (UFC. g <sup>-1</sup> solo seco). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.....	30
<b>Figura 2.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de fungos do solo, em meio de Martin, incubação a 28 °C, por 48 horas.....	31
<b>Figura 3.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de bactérias do solo (UFC. g <sup>-1</sup> solo seco). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.....	33
<b>Figura 4.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de bactérias do solo, em meio de Ágar Nutriente, incubação a 35 °C, por 24 horas..	34
<b>Figura 5.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de actinomicetos do solo (UFC.g <sup>-1</sup> solo). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.....	35
<b>Figura 6.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de <i>Pseudomonas</i> do solo (UFC.g <sup>-1</sup> solo). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.....	36
<b>Figura 7.</b> Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de <i>Pseudomonas</i> spp. no meio de B de King, incubação a 35 °C, por 24 horas.....	37
<b>Figura 8.</b> Matéria seca de raízes das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar com aplicação prévia dos fitorreguladores Ethrel e Moddus via foliar na muda. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.....	42
<b>Figura 9.</b> Matéria seca de raízes (g) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado (ST). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.....	43
<b>Figura 10.</b> Matéria seca de raízes (g) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 cultivadas em solo sem tratamento (SST), com tratamento (ST) e com a aplicação prévia dos fitorreguladores Ethrel e Moddus via foliar na muda. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.....	44

<b>Figura 11.</b> Altura (cm) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (A) e tratado (B), com aplicação dos fitorreguladores Moddus e Ethrel via solo .....	49
<b>Figura 12.</b> Matéria seca de raízes (g) para as variedades RB72454, RB855156 e RB835486 de cana-de-açúcar, cultivadas em solo sem tratamento (A) e tratado (B), com aplicação dos fitorreguladores Moddus e Ethrel via solo.....	50
<b>Figura 13.</b> Número de rizobactérias (UFC.g <sup>-1</sup> solo) isoladas de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores aplicados via solo. (A) Solo sem tratamento; (B) Solo tratado.....	52
<b>Figura 14.</b> Número de rizobactérias (UFC.g <sup>-1</sup> solo) isoladas de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores aplicados via foliar. (A) Solo sem tratamento; (B) Solo tratado.....	53
<b>Figura 15.</b> Colônias de rizobactérias isoladas da variedade RB855156, em meio B de King. Legenda: (A) solo tratado sem aplicação de fitorreguladores, (B) solo tratado com aplicação de Ethrel via foliar e (C) solo tratado com aplicação de Moddus via foliar.....	55
<b>Figura 16.</b> Antagonismo <i>in vitro</i> entre isolados de rizobactérias e o fungo <i>Fusarium</i> spp., em meio de cultura B de King.....	57
<b>Figura 17.</b> Antagonismo <i>in vitro</i> entre o isolado Ps1632 e o fungo <i>Fusarium</i> spp, em meio de cultura BDA.....	58
<b>Figura 18.</b> Antagonismo <i>in vitro</i> entre rizobactérias e os isolados Ps1631, Ps109 e Ps86 e o fungo <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	59
<b>Figura 19.</b> Antagonismo <i>in vitro</i> entre o isolado Ps1635 e o fungo <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , em meio B de King.....	60
<b>Figura 20.</b> Crescimento de rizobactéria, isolado Ps1635, e <i>Thielaviopsis paradoxa</i> em meio B de King suplementado com 0, 20, 50 e 100 µM de FeCl <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 21.</b> Isolados de rizobactérias não produtoras de ácido cianídrico (papel de cor amarela) e produtoras de ácido cianídrico (papel de cor laranja).....	62
<b>Figura 22.</b> A) Membrana de nitrocelulose corada com reagente de Salkowski evidenciando produção de ácido indol acético pelo isolado Ps1635. B) Halo de solubilização de fosfato inorgânico produzido pelo isolado Ps1634 em meio BDYA suplementado.....	65

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Características físicas e físico-químicas do solo utilizado nos experimentos em casa-de-vegetação.....	20
<b>Quadro 1.</b> Discriminação dos fatores componentes dos 18 tratamentos estudados.....	22
<b>Tabela 2.</b> Análise de variância para o número de UFC de fungos.g <sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.....	30
<b>Tabela 3.</b> Análise de variância para o número de UFC de bactérias.g <sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.....	32
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância para o número de UFC de actinomicetos.g <sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus..	34
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância para o número de UFC de <i>Pseudomonas</i> .g <sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus..	35
<b>Tabela 6.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de freqüência de brotação para o fator variedades.....	38
<b>Tabela 7.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de freqüência de brotação para o fator solo.....	38
<b>Tabela 8.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de freqüência de brotação para o fator fitorreguladores.....	38
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância para altura (cm) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via foliar.....	39
<b>Tabela 10.</b> Altura (cm) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado com brometo de metila (ST).....	40
<b>Tabela 11.</b> Altura de planta (cm) de variedades de cana-de-açúcar que tiveram prévia aplicação de fitorreguladores via foliar.....	40
<b>Tabela 12.</b> Análise de variância para matéria seca de raízes (g) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação prévia de fitorreguladores via foliar na muda.....	42

<b>Tabela 13.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator variedades.....	46
<b>Tabela 14.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator variedades.....	46
<b>Tabela 15.</b> Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator fitorreguladores.....	46
<b>Tabela 16.</b> Análise de variância para altura (cm) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via solo.....	47
<b>Tabela 17.</b> Altura (cm) de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado com brometo de metila (ST).....	47
<b>Tabela 18.</b> Análise de variância para matéria seca de raízes (g) de plantas de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via solo.....	49
<b>Tabela 19.</b> Antagonismo <i>in vitro</i> entre rizobactérias e fungos fitopatogênicos nos meios de cultura BDA e B de King, conforme escala classificatória de Martins et al.(2004), modificado <sup>1</sup> .....	56
<b>Tabela 20.</b> Influência de rizobactérias no desenvolvimento de plântulas da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação.....	63
<b>Tabela 21.</b> Eficiência de isolados de rizobactérias no controle da doença podridão abacaxi, causada por <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , em toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454.....	67

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE FITORREGULADORES EM RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*), NO MUNICÍPIO DE ARARAS-SP**

**Autora: SILVANA PERISSATTO MENEGHIN**

**Orientadora: Dra. SÂMIA MARIA TAU-K-TORNISIELO**

**RESUMO**

Nas usinas, no início da safra, a obtenção de matéria-prima de boa qualidade é maximizada com a aplicação de fitorreguladores, os quais aumentam o teor de sacarose da cana-de-açúcar. Em áreas onde eles são aplicados, tem se observado melhor desenvolvimento e perfilhamento das plantas. Avaliou-se aqui o efeito da aplicação dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o crescimento da cana-de-açúcar, de forma direta e indiretamente, através da modificação da microbiota rizosférica. Além disso, objetivou-se também avaliar o uso de rizobactérias, isoladas dos experimentos com fitorreguladores, para o biocontrole de doenças e seus possíveis mecanismos de ação. Os efeitos dos fitorreguladores sobre os microrganismos do solo foram avaliados em meios de cultura acrescidos de Ethrel e Moddus em concentrações de 0 a 1000 ppm. Estes fitorreguladores foram aplicados via foliar e via solo para análise do desenvolvimento da cana-de-açúcar (variedades RB72454, RB835486 e RB855156) em casa-de-vegetação, utilizando-se solo sem tratamento e tratado com brometo de metila. Após dez meses, foram avaliadas a brotação, altura e matéria seca da parte aérea e das raízes das plantas cultivadas. Rizobactérias foram isoladas dos solos contidos nos vasos e avaliadas *in vitro* quanto à capacidade de controle de fungos fitopatogênicos (*Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium spp.* e *Hendersonina sacchari*), e *in vivo*, quanto à capacidade de promoção de crescimento de plântulas de cana-de-açúcar. Alguns mecanismos de ação das rizobactérias foram também estudados, como produção de ácido indol acético, ácido cianídrico, sideróforos e solubilização de fosfato inorgânico. Constatou-se que as populações de fungos foram mais sensíveis à adição dos fitorreguladores do que outros grupos de microrganismos, com redução no número de

unidades formadoras de colônias (UFC) a partir da menor concentração testada (0,1 ppm), à semelhança do observado para o número de actinomicetos. As bactérias *Pseudomonas* fluorescentes apresentaram redução no número de colônias e menor número de colônias com características morfológicas diferentes na presença de Ethrel e Moddus, observando-se predomínio de colônias amarelo-esverdeadas produtoras de pigmentos liberados no meio de cultura. As bactérias mostraram-se mais tolerantes à ação dos fitorreguladores. As três variedades de cana-de-açúcar aqui estudadas responderam diferentemente ao Ethrel e Moddus, e também quanto à forma de aplicação dos mesmos, verificando-se benefícios na utilização, expressos em aumento da altura e da matéria seca de raízes das plantas. Os efeitos da aplicação dos fitorreguladores mostraram ser diretos e indiretos, pois a aplicação modificou a microbiota do solo, sendo selecionados isolados de rizobactérias que em testes *in vitro* mostraram ser capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium* spp., *Hendersonina sacchari* e *Thielaviopsis paradoxa*, e *in vivo* de promover o crescimento de plântulas, além de controlar a doença podridão abacaxi, causada por *T. paradoxa* em cana-de-açúcar variedade RB72454. O isolado Ps1635 destacou-se como o mais efetivo, utilizando como mecanismos de ação a produção de sideróforos, ácido cianídrico e ácido indol acético.

**Palavras-chave:** rizobactérias, biocontrole, fungos fitopatogênicos, cana-de-açúcar, fitorreguladores,

**EFFECT OF PLANT REGULATORS ON RHIZOBACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SUGAR CANE VARIETIES (*Saccharum* spp.), IN ARARAS (SÃO PAULO STATE)**

**Author: SILVANA PERISSATTO MENEGHIN**

**Adviser: Dr. SÂMIA MARIA TAU-K-TORNISIELO**

**ABSTRACT**

For sugar and alcohol industries, at the start of harvesting, to obtain good quality raw material is potentially possible with the application of plant regulators, which have a role in natural sugar cane maturation, increasing sucrose content. In areas where they have been applied, better plant development and shooting have been observed. The aim here was to evaluate the application of plant regulators Ethrel and Moddus on sugar cane growth, not only in a direct way, but also indirectly, through the modification of rhizosphere microorganisms. Besides, this work also aimed the evaluation of rhizobacteria isolated from the experiments using plant regulators upon the disease biocontrol and their action mechanisms in this respect. The effects of plant regulators upon the soil microorganisms were verified in culture media where Ethrel and Moddus were added in concentrations ranging from 0 to 1000 ppm, while the effects of these substances (applied in leaves and in soil) upon the sugar cane development (varieties RB72454, RB835486 and RB855156) were surveyed in greenhouse, using soil without treatment and treated with methyl bromide. After a ten-month period, the experiments were finished, and sprouting, height and aerial part and root dry matter were analyzed. Soil samples were taken from the pots for rhizobacteria isolation, which were evaluated initially *in vitro* regarding their ability to control plant pathogenic fungi (*Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium* spp. and *Hendersonina sacchari*), and *in vivo*, regarding their ability to promote sugar cane growth. Some action mechanisms were also studied, as indol acetic acid, cyanide acid and siderophore production and inorganic phosphate solubilization. It was verified that the fungi populations were more sensitive to the addition of plant regulators than other microorganisms, reducing their colony-forming unit (CFU) numbers from the lowest concentration (0.1 ppm), similarly to the results

observed for actinomycetes. Fluorescent bacteria from *Pseudomonas* genus were also affected by Ethrel and Moddus, resulting in a decrease in CFU number and lower colony number with different morphological characteristics, with predominance of greenish-yellow colonies producing pigments released into the culture media. The bacteria were more tolerant to the action of plant regulators. The three sugar cane varieties responded differently to Ethrel and Moddus and to the application way, with benefits (increased numbers) to the height and root dry matter. Direct and indirect effects of the plant regulators were observed, once their applications modified the microbial communities. Isolates of rhizobacteria were shown to be capable to inhibit the growth of pathogenic fungi in *in vitro* tests and also to promote the growth of sugar cane plants as well as to biocontrol the pineapple disease, caused by *T. paradoxa*, in the variety RB72454. The isolate Ps1635 was the most effective, using siderophore, cyanide and indol acetic acid production as action mechanisms.

**Key-words:** growth-promoting rhizobacteria, biocontrol, sugar cane, plant regulators, plant pathogenic fungi

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com previsão para a industrialização, na safra 2007/2008, de 547,2 milhões de toneladas de cana-de-açúcar utilizadas na produção de 30 milhões de toneladas de açúcar e 21,3 bilhões de litros de álcool (Companhia Nacional de Abastecimento, 2007).

O período de colheita e industrialização da cana-de-açúcar inicia-se em abril e se estende até novembro na região Sudeste. Durante esses meses, a indústria de processamento de cana-de-açúcar precisa receber matéria-prima de boa qualidade, para que a relação custo/benefício da recuperação do açúcar ou de sua transformação em álcool seja viável (HUMBERT, 1968). O processo de maturação da cana-de-açúcar ocorre naturalmente a partir de abril/maio, atingindo seu clímax no mês de setembro. Esse fenômeno ocorre em virtude das condições climáticas, de gradativa queda da temperatura e diminuição das precipitações até a seca total no meio do ano. Nesse período, a planta tem seu crescimento finalizado, mas com a continuidade da fotossíntese, seus produtos são deslocados rapidamente e armazenados nos tecidos de reserva do colmo (DEUBER, 1988).

Existem locais onde as condições edafoclimáticas não favorecem a maturação natural, como também empresas que não dispõem de variedades de cana que amadureçam precocemente e que possam abastecer a indústria no início da safra. Neste caso, uma solução alternativa é o uso de fitorreguladores.

Existem no mercado vários produtos funcionando como reguladores de crescimento ou restritivos de crescimento das regiões terminais; em ambos os casos, eles atuam sobre os fotossintatos produzidos, favorecendo seu acúmulo nos tecidos de

reserva do colmo e proporcionando um incremento de sacarose (MUTTON, 1998). Nos locais onde esses produtos são aplicados, observa-se, após o corte, uma tendência para brotação mais rápida da soqueira, maior perfilhamento, colmos mais pesados e maior desenvolvimento do sistema radicular (PAGGIARO et al., 1995). Como essas características são desejáveis, já que resultam em ganhos significativos na produtividade, passou-se a testar a aplicação dos fitorreguladores diretamente no sulco de plantio. Em alguns casos houve grandes ganhos na produtividade e em outros, pouco ou nenhum benefício, não tendo sido encontrada explicação para tais constatações (CAMPANHÃO, 1995).

No entanto, há de se considerar o papel da microbiota do solo, especialmente a rizosférica, nos agrossistemas. Os microrganismos do solo podem responder rapidamente às mudanças acarretadas por alterações no ambiente, como por exemplo, a utilização de fertilizantes orgânicos e minerais e/ou de pesticidas (HALE et al., 1978; VANCURA e KUNC, 1988; BOLTON JUNIOR et al., 1992, SILVA et al., 2004). Além disso, a comunidade microbiana pode ser modificada quando qualquer substância é aplicada às folhas das plantas, e por elas absorvida, ocasionando modificações no metabolismo dessas, afetando os exsudados radiculares, e desta forma também os fatores abióticos e bióticos presentes na rizosfera (SMITH, 1976).

Há predominância de bactérias gram-negativas não esporulantes na rizosfera e nas superfícies das raízes das plantas, com um número bastante elevado de *Pseudomonas* (ALEXANDER, 1977; VANCURA e KUNC, 1988; FREITAS, 1994). Segundo Bowen e Rovira (1999), esses organismos são freqüentemente colonizadores de rizosfera porque estão associados à matéria orgânica, constituindo um grupo nutricionalmente diverso e com rápida taxa de crescimento. Desta forma, estes têm capacidade bastante elevada de competir por energia e nutrientes, produzindo vitaminas e compostos análogos aos hormônios vegetais, que podem ser absorvidos e translocados pela planta, proporcionando-lhe um melhor desenvolvimento (VANCURA e KUNC, 1988).

Estas considerações suscitam dúvidas quanto ao papel dos fitorreguladores no desenvolvimento vegetal, se de forma direta ou indireta, agindo sobre a microbiota rizosférica, além da forma como ocorre a promoção de crescimento vegetal, por exemplo, em função do biocontrole de patógenos.

Desta forma, considerando-se os pontos acima expostos, os objetivos deste presente estudo são:

- a. verificar o efeito da aplicação de fitorreguladores no desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar;
- b. observar as possíveis alterações do número de microrganismos do solo cultivado com cana-de-açúcar e com aplicação de fitorreguladores;
- c. isolar e avaliar a atividade das rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas e como agentes de biocontrole;
- d. identificar os mecanismos de ação das rizobactérias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Rizobactérias

Rizobactérias são definidas como bactérias que vivem na rizosfera de plantas, ou seja, região de influência das raízes, sendo estimuladas pelos seus exsudatos. Os exsudatos radiculares consistem de compostos de baixo peso molecular, como açúcares, polissacarídeos simples, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, nucleotídeos e enzimas (ROVIRA, 1969; VANCURA e KUNG, 1988; BERTIN et al., 2003). Estes compostos são liberados parcialmente pelas raízes no solo rizosférico, servindo de fonte de alimento, ou em alguns casos como sinais moleculares para a associação de plantas com os microrganismos (DE LA FUENTE et al., 2007). O efeito da rizosfera sobre os microrganismos é mais favorecida nas bactérias (ALEXANDER, 1977), mas não é específico, favorecendo a presença de vários grupos morfológicos e fisiológicos, e dentre estes, as bactérias gram-negativas do gênero *Pseudomonas*, com o maior número de espécies dentro do grupo das fluorescentes (ZAGO et al., 2000; BOTELHO et al., 2006). Isto se deve à sua alta taxa de crescimento, à pronta resposta à adição de aminoácidos e açúcares solúveis, capacidade de crescer em ambientes muito variados, e produção de uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento (MELO, 1998).

As rizobactérias interagem com as plantas de várias maneiras, podendo promover o crescimento destas, sendo, portanto, chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (RPCPs), atuando de forma direta através da produção de reguladores de crescimento, aumentando a permeabilidade das raízes, estimulando a formação de pelos radiculares, solubilizando fosfato e outros nutrientes e desta forma, estimulando a absorção dos mesmos (CATTELAN e HARTEL, 2000). Podem atuar

também de forma indireta pelo controle biológico de patógenos ou de microrganismos deletérios através da produção de metabólitos que agem diretamente sobre o patógeno (sideróforo, ácido cianídrico, antibióticos e enzimas que degradam a parede celular) ou ainda através de indução de resistência sistêmica (KLOEPER, 1993). Como agentes de biocontrole, antagonizam patógenos principalmente através da antibiose, que é definida como interação, onde um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro. A espécie *Pseudomonas fluorescens* é um exemplo de microrganismo onde a ação antagônica depende principalmente da antibiose (KREMER e GROSSMANN, 1994 citado por STADNIK e BETTIOL, 2000).

Os antibióticos são compostos de baixo peso molecular que, em pequenas concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988). Existe uma grande diversidade de antibióticos produzidos por diferentes linhagens de *Pseudomonas*, como fenazinas, pirrolnitridinas, pioluteorinas, tropolonas, piocianinas e 2,4 diacetillfloroglucinol. Embora pouco se conheça sobre o papel dos antibióticos na ecologia e fisiologia dos microrganismos, estudos moleculares e genéticos comprovaram que a supressão de algumas doenças de raízes é mediada quando estes são produzidos pelas rizobactérias (MELO, 1998; ZAGO et al., 2000). Howell e Stipanovic (1979) apresentaram provas diretas do envolvimento do antibiótico pioluteorinas na inibição *in vitro* e *in vivo* do crescimento de *Pythium ultimum*, agente causal do “damping-off” de algodão, enquanto que a pirrolnitridina foi mais eficiente contra *Rhizoctonia solani*. Os fluoroglucinóis são muito eficientes contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, e entre eles, o 2-4 diacetillfloroglucinol é o melhor estudado em virtude de ser o principal metabólito associado à supressão de várias doenças (KEEL et al., 1996), entre elas a podridão negra do tabaco e a podridão do pé do trigo, e é também o metabólito responsável pela supressividade natural de alguns solos a certos patógenos (WELLER et al., 2007). Mazzola et al. (1992), citados por Zago et al. (2000), mostraram que a síntese de fenazina não está apenas associada à inibição de doenças radiculares, mas também à capacidade adaptativa do organismo ao ambiente.

O ácido cianídrico também tem sido apontado como um metabólito de *Pseudomonas* spp. fluorescente capaz de inibir bactérias e fungos fitopatogênicos (NEHL et al., 1996). Outros autores relataram que este ácido pode inibir o crescimento

de plantas (BAKKER e SCHIPPERS, 1987) ou mesmo em alguns casos, estimular o desenvolvimento de pelos radiculares (LUZ, 1996).

A resistência induzida é outro mecanismo de supressão de doença, na qual a própria planta ativa suas defesas químicas e físicas na presença de um indutor, que pode ser uma substância química ou um patógeno, levando ao controle deste último (KLOEPPER et al., 1992). O agente indutor pode ser um ativador químico, como os derivados benzotriazolônicos e outros compostos, extratos de células de organismos vivos, ou microrganismos vivos. Neste último caso, quase sempre os agentes são rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e diz-se que o mecanismo é a indução de resistência sistêmica mediada por RPCPs.

Os mecanismos utilizados pelas rizobactérias para promover o crescimento das plantas não estão totalmente esclarecidos, tendo como prováveis modos de ação a produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas (BAREA et al., 1983), a fixação de nitrogênio (BURR e CAESAR, 1985), a mineralização de fosfatos e/ou outros nutrientes do solo (MEYER e LINDERMAN, 1986), a exclusão de nicho (BAKKER e SCHIPPERS, 1987) e o antagonismo contra patógenos ou outros microrganismos deletérios (SIMEONI et al., 1987).

O crescimento das plantas também pode ser promovido indiretamente através da produção de sideróforos, que são substâncias capazes de formar complexos com o  $Fe^{+3}$ , sendo produzidos por microrganismos em condições de baixa disponibilidade do elemento. O ferro é um elemento abundante nos solos, mas sua disponibilidade é limitada em ambientes aeróbios e com pH na faixa da neutralidade. Trata-se de um elemento essencial para todo tipo de organismo vivo, porque participa como componente de muitas enzimas vitais, dos citocromos da cadeia transportadora de elétrons e em um grande número de funções biológicas. As bactérias *Pseudomonas* do solo produzem sideróforos verde-amarelados, fluorescentes, solúveis em água, também chamados de pioverdinas ou pseudobactinas (MEYER e ABDALLAH, 1978).

A produção de pigmentos fluorescentes é característica de um grupo intra-genérico de *Pseudomonas*, geneticamente homólogo, cujas espécies são *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescens*. Segundo a literatura, RPCPs produtoras de sideróforos promovem o crescimento vegetal pelo controle biológico de fitopatógenos, privando de ferro a microbiota nativa. De acordo com tal hipótese, as RPCPs inoculadas

colonizariam rapidamente a rizosfera com pouco ferro disponível no rizoplano. As bactérias produziram sideróforos que complexariam o nutriente e o tornaria indisponível para outros microrganismos, inibindo assim o crescimento deles (KLOEPPER et al., 1980). Sua concentração na solução do solo está relacionada com os níveis de pH, de forma que à medida que o pH do solo abaixa, a disponibilidade de ferro aumenta e os sideróforos se tornam menos efetivos. Em geral, os patógenos do solo são bastante sensíveis à ação dos sideróforos produzidos pelos antagonistas, em virtude de não o produzirem, ou quando produzidos, estes terem menor afinidade pelo ferro (MELO, 1998).

Muitos reguladores de crescimento vegetal são produzidos por microrganismos do solo e da rizosfera. Barea et al. (1983) obtiveram 50 isolados de bactérias, predominantemente *Bacillus* e *Pseudomonas*, das rizosferas de diversas culturas de importância econômica, sendo que destas, 43% produziram substâncias semelhantes a cinetina; 43% produziram auxinas; 24% produziram giberelinas; e 20% sintetizaram os três tipos de substâncias de crescimento. Estas podem atuar sobre a planta inteira, raízes ou parte aérea (BURR et al., 1978; SUSLOW e SCHROTH, 1982). As auxinas podem promover o crescimento radicular, aumentar a produção de raízes laterais estimulando o crescimento e o alongamento das células e atuando na permeabilidade celular, e as giberelinas podem estimular o alongamento dos caules.

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar substâncias a partir de componentes ou compostos presentes nos exsudatos radiculares, como por exemplo, sintetizar ácido indolacético (IAA) a partir do triptofano (SIQUEIRA, 1993). Frankenberger Junior e Poth (1987) demonstraram a habilidade da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, isolada de gramínea, em converter L-triptofano em ácido indol acético pela supressão do ferro. *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* também têm sido relatadas como eficientes na produção de citocininas, utilizando a adenina presente nos exsudatos radiculares como precursora para a transformação (NIETO e FRANKENBERGER JUNIOR, 1989).

## 2.2. Fitorregulador ou Regulador Vegetal

Fitorregulador é um termo empregado para designar substâncias vegetais que, aplicadas exogenamente, possuem ações similares aos hormônios vegetais, como citocininas, giberelinas, ácido indol acético e etileno (LAC-BUENDIA, 1989; ALLEONI et al., 2000; VIEIRA e CASTRO, 2002; DOURADO NETO et al., 2004). Segundo TAIZ e ZEIGER (2003), na prática, os fitorreguladores podem ser aplicados em diferentes partes das plantas como pecíolos, folhas, frutos e sementes, atuando no próprio local ou serem translocados, atuando então em outras partes da planta e interferindo nos diversos processos como germinação, enraizamento, floração, frutificação, maturação e senescência.

Na agricultura, o uso de fitorreguladores tem-se tornado uma prática comum, que contribui para a solução dos problemas dos sistemas de produção, melhorando qualitativa e quantitativamente a produtividade de diferentes culturas, como a cana-de-açúcar (LUCHESE et al., 1979; ALMEIDA et al., 2005); enraizamento para viabilização de mudas por meio de estaquia (FANCHIELO et al., 1995, NORBERTO et al., 2001); crescimento e produtividade em amendoim (CASTRO e APPEZZATTO-DA-GLÓRIA, 1993); emergência e crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (LEONEL e PREDOSO, 2005); crescimento de plantas de milho (DOURADO NETO et al., 2004, PRADO NETO et al., 2007) e desenvolvimento inicial do sistema radicular em algodão (NAGASHIMA et al., 2005, VIEIRA e SANTOS, 2005, LAMAS, 2001), mamona (ALBUQUERQUE et al., 2004), soja (CAMPOS et al., 2007), feijão (ALLEONI et al., 2000) e plantas medicinais (STEFANINI et al., 2002). Sua utilização na agricultura traz benefícios como incrementos na porcentagem de germinação, na altura das plantas, no número de folhas, flores e frutos, na qualidade destes últimos e no desenvolvimento do sistema radicular, entre outros.

Diversos produtos estão registrados no Brasil como fitorreguladores para a cultura da cana-de-açúcar, entre eles, o glifosato, paraquate, fluazifop-p-butyl, etil-trinexapac e ethephon (ALMEIDA et al., 2005), todos eles visando basicamente antecipar a maturação e aumentar os teores de sacarose no caldo (RODRIGUES, 1995; ALMEIDA et al., 2005), a germinação e o perfilhamento de toletes (LUCHESE et al., 1979).

Durante seu ciclo de vida, a cana-de-açúcar passa por dois períodos distintos, o primeiro denominado vegetativo, onde ocorre o crescimento e desenvolvimento da planta sob condições ótimas de temperatura e umidade; no segundo período, ocorre o acúmulo de sacarose, em virtude da diminuição da temperatura atmosférica e da precipitação pluviométrica. Na região Sudeste (São Paulo), este último ocorre entre os meses de maio a setembro. Segundo Vieira (1988), a sacarose é produzida nas folhas, a partir de glicose e frutose, com a participação da enzima invertase. Após sua biossíntese nas folhas, segue pelas nervuras secundárias, nervura central e bainha, alcançando o colmo, onde é distribuída para as demais partes da planta (raízes, ápice, folhas e internódios jovens) para o crescimento de paredes celulares e do protoplasma.

A sacarose nas células de armazenamento do colmo sofre uma série de transformações e acumula-se nos vacúolos armazenadores, onde sofre a ação da invertase ácida vacuolar, fornecendo hexoses que são utilizadas nos processos de síntese protéica e respiração. Com o desenvolvimento do colmo, a atividade da invertase ácida vacuolar começa a diminuir, aumentando simultaneamente a atividade da invertase neutra, o que indica a maturidade do tecido para a acumulação da sacarose (MADAN et al., 1980).

Existem locais sem condições edafoclimáticas propícias para que a maturação natural ocorra como também empresas que não dispõem de variedades que amadureçam precocemente e que possam abastecer a indústria no início da safra. A aplicação de fitorreguladores é uma técnica alternativa que proporciona a antecipação do corte e o aumento do percentual de sacarose (RODRIGUES, 1995, MUTTON, 1998; ALMEIDA et al., 2005).

Um produto utilizado amplamente como regulador vegetal e desenvolvido para ser utilizado como maturador da cultura e estimulante do aumento de conteúdo de sacarose nos colmos é o Etil-trinexapac, que pertence ao grupo químico do ciclohexano, derivado do ácido carboxílico e cujo nome químico é 4 (ciclopropil- $\alpha$ -hidroxi-metileno-3,5-dioxociclohexano carbocílico ácido etil éster), conhecido comercialmente como Moddus. Quando aplicado, este é absorvido pelas gemas apicais e folhas das plantas, passando a atuar na síntese de giberelina, reduzindo sua concentração ativa, induzindo a planta a uma inibição temporária ou redução do ritmo de crescimento, sem afetar o

processo de fotossíntese e a integridade da gema apical (RODRIGUES, 1995, SYNGENTA, 2008)

Outro fitoregulador bastante conhecido e utilizado em cana-de-açúcar é o ethephon, conhecido pelo nome comercial de Ethrel, concentrado emulsionável contendo 480 gramas por litro de ingrediente ativo de ácido 2-cloroetil fosfônico, que é usado como estimulante da maturação da cana-de-açúcar (BAYER, 2008)

O ácido 2-cloroetil fosfônico, em solução aquosa, degrada-se lentamente, originando etileno, íons cloro e ácido fosfórico (SMITH, 1973). Este produto, quando pulverizado sobre as plantas, aumenta os teores internos de etileno, bloqueando a produção de auxinas e reduzindo a produção de giberelina ativa, resultando na redução do crescimento do entrenó em formação durante a pulverização, sem provocar a morte parcial ou total do ápice da planta, o que resulta em menor crescimento dos colmos e aumento dos conteúdos de sacarose (CASTRO, 1992; RODRIGUES, 1995, CASTRO et al., 2001.; MUTTON, 1998). A aplicação de etileno exógeno ou o aumento de sua síntese, ocasionada por aplicações de reguladores vegetais, estimula a atividade da enzima PAL (fenilalanina amonioliase), que leva a planta a aumentar a síntese de compostos fenólicos. A utilização de ethephon como maturador vegetal tem sido utilizado no Brasil e em várias regiões do mundo, como Havaí, África do Sul, Louisiana-EUA (RODRIGUES, 1995).

A utilização do ácido 2-cloroetil fosfônico traz inúmeros benefícios para a cultura da cana-de-açúcar, resultando em diminuição do número de gemas utilizadas no plantio por metro linear, aumento na velocidade de emergência das gemas (CAMPOS, 1963; MELLOTO et al., 1987; PAGGIARO, 1992), aumento na altura das plantas (PAGGIARO et al., 1995, CASTRO, 1993), aumento no número de perfilhos por metro (CAMPOS, 1963; CASTRO, 1993), precocidade de maturação (CASTRO, 1992; MORGAN et al., 2001), antecipação do corte (CASTRO, 1999), aumento no número de colmos industrializáveis (LUCHESE et al., 1979), aumento da quantidade de cana colhida por hectare (CAMPOS, 1963), incremento nos teores de açúcar e álcool (CALÇA et al., 1984; CASTRO, 1993), aumento da taxa de macronutrientes das plantas tratadas (GONÇALVES, 1984) e redução do florescimento e isoporização (CAMPOS, 1963; CASTRO, 1993; 1999).

Embora a maioria dos estudos com Ethrel em cana-de-açúcar estejam relacionados aos aspectos de maturação, outros trabalhos relatam os benefícios de sua utilização como estimuladores de germinação, crescimento e desenvolvimento, assim como no controle de doenças causados por fungos e bactérias (MACEDO e AZEVEDO, 1990, NASCIMENTO, 1999).

O etileno, assim como os geradores de etileno (por exemplo, o ethephon) podem elicitar a produção de fitoalexinas, compostos que combatem fungos e bactérias em plantas. O tratamento de plantas com gás etileno ou com o ethephon reduziu a frequência de ocorrência de várias doenças (LOCKHART et al., 1968; HISLOP et al., 1973; STAHMANN et al., 1966 citado por FRANKENBERGER JUNIOR et al., 1995).

Pegg (1981) citado por Pascholati (1995) demonstrou que as plantas tratadas com etileno apresentaram diminuição de infecção ou sintomas de doenças. O etileno induz trocas nas enzimas associadas com a resistência e estimula a biossíntese de conhecidos antifúngicos utilizados para promover o crescimento de raízes, desenvolvimento de caules, maturação, floração e na incidência de doenças. Na cultura da soja, além de antecipar sua maturação, diminuiu a incidência de fungos em suas sementes (ABNEY, 1991).

O etileno também pode estimular doenças (aparentemente pela indução do desenvolvimento da hifa de infecção que penetra no tecido) ou inibir o desenvolvimento micelial e estimular a esporulação de fungos, mas pode induzir resistência em frutas verdes, quando sua aplicação antecede a inoculação do fungo (BROWN e BARMORE, 1977). Segundo esses mesmos autores, o etileno pode tanto aumentar como reduzir a incidência de doenças, dependendo do tempo de exposição e da concentração utilizada.

Nos vegetais, o etileno é produzido endogenamente por todos os órgãos (raízes, colmos, folhas, gemas, bulbos, flores e sementes) em doses variáveis, dependendo do estágio de desenvolvimento e crescimento da planta. Em geral, a quantidade é elevada em tecidos jovens, mais baixa em tecidos adultos, aumentando em tecidos senescentes (KENDE e BAUMGARTNER, 1974).

No solo, além das raízes das plantas e das reações enzimáticas que liberam etileno, os maiores produtores destes são os microrganismos (BABIKER e PEPER, 1984). A quantidade de etileno produzida por eles é suficiente para afetar outros microrganismos e também o crescimento das plantas, dependendo da sua concentração

e também da suscetibilidade das raízes das plantas à ação do etileno. Este, quando liberado pela aplicação exógena de ethephon via solo, também irá compor a atmosfera do solo, e seu efeito sobre a planta e microrganismos dependerá da concentração existente nas raízes (KONINGS, 1975 apud VANCURA e KUNC, 1988).

O acúmulo de etileno no solo tem efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (ROVIRA e VENDRELL, 1972), podendo favorecer seu crescimento (SMITH e RESTALL, 1971) ou causar injúrias nas raízes (SMITH e ROBERTSON, 1971). Em geral, baixas concentrações estimulam o crescimento de raízes, enquanto que concentrações mais elevadas o inibem. O acúmulo de etileno tem efeito também sobre os microrganismos do solo, em especial sobre os fungos, pela indução da fungistase, e também em condições de nutrição limitada pela lise das suas hifas (SMITH, 1973; VANCURA e KUNC, 1988). Smith (1973) ressaltou que, não apenas o etileno é responsável pelo controle das populações microbianas no solo, mas também os compostos nos quais ele se transforma. Como é capaz de provocar modificações na microbiota do solo, terá implicações importantes nos processos de decomposição da matéria orgânica.

Actinomicetos, bactérias e alguns nematóides também são inibidos pelo etileno (SMITH e COOK, 1974), sendo as bactérias mais tolerantes que os actinomicetos, e estes mais que os fungos (SMITH, 1976). As bactérias podem proliferar em solos onde a quantidade de etileno é elevada, porque aparentemente esses microrganismos não são afetados pelo gás ou seus subprodutos. O etileno poderá indiretamente limitar a atividade das bactérias aeróbias, pela diminuição do crescimento dos fungos e actinomicetos (FRANKENBERGER JUNIOR e ARSHAD, 1995).

É difícil determinar a quantidade necessária de etileno para que a fungistase ocorra no solo. Muitos experimentos têm mostrado claramente que concentrações/traços de etileno inibem efetivamente a atividade de muitos fungos. Solos ricos em matéria orgânica produzem altas concentrações de etileno, mas por outro lado requerem mais altas concentrações desse elemento para inibir a germinação de propágulos de fungos. O balanço entre esses fatores determina quando um solo é fungistático e por quanto tempo (SMITH, 1973).

Os benefícios citados, associados ao fato de que estes produtos não interferem nos processos fermentativos e propiciam um retorno econômico médio por

hectare, comprovam as vantagens do uso de fitorreguladores na cultura da cana-de-açúcar (MUTTON, 1998).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) e em casa-de-vegetação, pertencentes ao Departamento de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Araras.

#### **3.1. Fitorreguladores utilizados**

Foram utilizados os seguintes fitorreguladores:

- Ethrel<sup>®</sup> 48 SL, fabricado pela Bayer CropScience S.A., registro S.A.G n° 4013, classificado como regulador vegetal. Possui como ingrediente ativo Ethephon, cujo nome químico é ácido-2-cloroetil-fosfônico, derivado do grupo do ácido fosfórico, e comercializado na concentração de 480 g L<sup>-1</sup> de concentrado solúvel.

- Moddus<sup>®</sup>, fabricado pela Syngenta, classificado como regulador de crescimento, cujo ingrediente ativo é o Etil-tinexapac, com nome químico de 4 (ciclopropil-&-hidroxi-metileno-3,5-dioxociclohexanocarbo-cílico ácido etil éster), derivado do grupo da ciclohexadiona, comercializado na concentração de 250 g L<sup>-1</sup> do concentrado emulsificável (EC).

#### **3.2. Variedades de cana-de-açúcar**

As variedades utilizadas (PMGCA, 2008) foram:

-RB72454, obtida pelo Instituto do Açúcar e Alcool /Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar, com as seguintes características botânicas e industriais: touceiramento médio, com colmos eretos, empalhados, de diâmetro médio, e de cor verde clara, com manchas de cera escurecidas; entrenós médios, alinhados em leve zigzag; com folhas dispostas em forma contorcida, de largura e comprimento médios, e com pouco joçal; alta produtividade; baixa exigência em solo; boa brotação de soqueira; alto teor de sacarose; e de maturação médio-tardia.

-RB835486, obtida pela equipe do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar (PMGCA) da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, campus Araras. Apresenta touceiras ralas, colmos medianamente empalhados, de fácil despalha, diâmetro médio a grosso e de elevado peso, cor arroxeada, com abundante cera; entrenós médios e bainha sem joçal; alta produtividade; baixa exigência de solo; boa brotação de soqueira; teor de sacarose altíssimo; e maturação precoce-tardia.

-RB855156, obtida pela equipe do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar (PMGCA) da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, campus Araras. Com elevado touceiramento, principalmente na soca, colmos eretos mas decumbentes na fase adulta, empalhados, diâmetro fino a médio, cor verde clara, com pouca cera, e bastante rachadura; entrenós médios, bainha com abundante joçal; produtividade alta; exigência média de solo; difícil brotação de soqueira, bom perfilhamento; teor de sacarose alto; e de maturação precoce.

### **3.3. Meios de cultura e soluções**

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, a 120 °C, 1 atm, por 15 minutos.

- *Meio B de King para produção de pigmentos fluorescentes*

Proteose peptona nº 3	20,0 g
Glicerol	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Bacto Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	7,2

Para meio de cultura líquido, não foi adicionado o Bacto Ágar.

- *Meio de Martin seletivo para fungos e leveduras*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Rosa Bengala	0,03 g
Bacto Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 mL
Estreptomicina*	0,1 g

\*Adicionar a estreptomicina ao meio após a esterilização, dissolvida em 10 mL da água esterilizada.

Conservar o meio em frasco escuro.

- *Meio de Ágar Nutriente seletivo para bactérias*

Ágar Nutriente	23,0 g
Água destilada	1000 mL
Nistatina*	0,042 g

\*Adicionar a nistatina ao meio de cultura após a esterilização, dissolvida em 10 mL da água esterilizada.

- *Meio de Ágar-Água Alcalinizado seletivo para actinomicetos*

Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	10,5

Ajustar o pH do meio de cultura antes da esterilização com NaOH 1N.

- *Meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA)*

Batata Dextrose Agar	39,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,0

- *Meio de BDYA suplementado com fosfato inorgânico*

Batata Dextrose Agar	39,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Água destilada	1000 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10% estéril*	50 mL
CaCl <sub>2</sub> 10% estéril*	10 mL

\*Adicionar após esterilização

- *Meio Luria-Bertani Agar suplementado*

Bacto-triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	5,0 g
L-triptofano	1,02 g
Glicerol	10,0 g
Dodecil sulfato de sódio	0,6 g
Água destilada	1000 mL
pH	7,0-7,5

- *Meio Tryptic Soy Agar suplementado*

Tryptic Soy Agar	40,0 g
Glicina	4,4 g
Água destilada	1000 mL

- *Solução salina*

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000 mL

Conservar na geladeira após esterilização.

- *Solução de Tween 80*

Tween 80	0,05 mL
Água destilada	99,95 mL

Conservar na geladeira após esterilização.

- *Solução de ácido pícrico*

Ácido pícrico	2,5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	12,5 g
Água destilada	1000 mL

- *Reagente de Salkowski*

FeCl 0,5 M*	2 mL
Ácido perclórico 35%	98 mL

\* Armazenar em frasco escuro

### 3.4. Efeito da adição de fitorreguladores sobre a comunidade microbiana do solo

O efeito dos fitorreguladores Moddus e Ethrel sobre a comunidade microbiana do solo foi avaliado *in vitro*, utilizando-se os meios de cultura Agar Nutriente, Martin (MARTIN,1950), Agar-Água Alcalinizado e B de King (KING et al.,

1954), para a quantificação de bactérias, fungos, actinomicetos e *Pseudomonas* spp., respectivamente. Os fitorreguladores, após esterilização em filtro Millipore® (membrana de 0,22 µm) foram diluídos em água esterilizada e adicionados aos meios de cultura para obtenção das concentrações finais de 0,1; 1; 10; 100 e 1000 ppm. Amostras de solo aderido às raízes da variedade de cana-de-açúcar RB72454 foram cuidadosamente coletadas, armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, procedendo-se em seguida a separação das raízes e o peneiramento do solo. Subamostras de 10 g foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 90 mL de solução salina e agitados por 15 minutos. A partir destas suspensões foram realizadas diluições seriadas, semeando-se alíquotas de 0,1 mL, em duplicata, nos meios de cultura suplementados com os fitorreguladores. As placas foram incubadas a 28 °C para o desenvolvimento de colônias de fungos e *Pseudomonas* e a 35 °C para as bactérias. As avaliações foram realizadas após 24 horas para bactérias, 48 horas para fungos e para *Pseudomonas*, e após sete dias para actinomicetos, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC g<sup>-1</sup> solo).

Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F ao nível de 5% de probabilidade e, posteriormente, as comparações das médias pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Statistica 6,0 (LEWICKI e HILL, 2005).

### **3.5. Experimentos em casa-de-vegetação**

#### *3.5.1. Caracterização do solo*

Como substrato para os experimentos de casa-de-vegetação utilizou-se amostras de solo coletado na camada de 0 - 20 cm de profundidade da quadra nº 11 do Centro de Ciências Agrárias (CCA/Araras), classificado como Latossolo Vermelho distroférico típico, LV<sub>df</sub>. Amostras de solo foram enviadas ao Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, CCA/UFSCar, para a realização das análises físicas e físico-químicas, cujos resultados estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características físicas e físico-químicas da amostra do solo utilizado nos experimentos em casa-de-vegetação

pH	M.O.	P <sub>(resina)</sub>	Al	H+Al	K	Ca	Mg	S	SB	CTC	V
(CaCl <sub>2</sub> )	(g.dm <sup>-3</sup> )	(mg.dm <sup>-3</sup> )				(mmolc. dm <sup>-3</sup> )					(%)
5,7	30	8	28	0,3	1,3	41	17	16	59	87,3	68

*Legenda:* **M.O.** – matéria orgânica; **P resina;** **H+Al** - acidez potencial; **SB** - soma de bases (soma dos teores de K+Ca+Mg); **CTC** - capacidade de troca de catiônica; **V%** - saturação por bases; **mmolc.dm<sup>-3</sup>** – milimol de carga por decímetro cúbico.

### 3.5.2. Preparo das mudas

Para o plantio de cana-de-açúcar foram utilizados colmos tratados previamente com os fitorreguladores Ethrel e Moddus, nas concentrações indicadas por seus fabricantes, ou seja, 0,67 L ha<sup>-1</sup> e 0,8 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Ambos os produtos foram aplicados nas variedades de cana-de-açúcar RB72454, RB835486 e RB855156 quando estas contavam com 10 meses de idade. Os produtos foram diluídos em água não clorada e, foram aplicados sobre as plantas utilizando um pulverizador costal. Após 40 dias da data da aplicação, os colmos foram cortados em mini-toletes contendo apenas uma gema, os quais foram utilizados nos experimentos posteriores de avaliação do efeito residual dos produtos no desenvolvimento das variedades de cana-de-açúcar.

### 3.5.3. Avaliação do efeito residual em mudas de cana-de-açúcar dos fitorreguladores Ethrel e Moddus

A amostra do solo coletado foi destorroado e peneirado (malha de 4 mm) e dividida em duas partes iguais. Uma delas foi tratada com brometo de metila, colocando-se as amostras do solo sobre o piso e, após a abertura da lata contendo o gás, cobrindo-se com filme plástico impermeável por 48 horas. Após este período, o solo foi descoberto e revolvido várias vezes para a eliminação dos gases tóxicos e designado aqui como solo tratado (ST). A outra parte não recebeu nenhum tratamento e foi

designada como solo sem tratamento (SST). As correções no solo foram realizadas seguindo-se as recomendações técnicas fornecidas pelo Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, CCA/UFSCar.

Os solos foram acondicionados em sacos plásticos pretos de polietileno com 35 cm de diâmetro por 40 cm de altura. Em cada saco foi depositado um mini-tolete (pequeno pedaço do colmo da cana-de-açúcar contendo apenas uma gema). Em seguida, os toletes foram cobertos com uma fina camada de solo, suficiente apenas para cobrir as gemas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 18 tratamentos e quatro repetições por tratamento (Quadro 1), num esquema fatorial 2x3x3x1, envolvendo dois tratamentos para cada amostra do solo (SST e ST), três tipos de soluções para pulverização das plantas (solução de Ethrel, Moddus e água), três variedades de cana-de-açúcar (RB72454, RB855156 e RB835486) e uma única forma de aplicação, via foliar. Os mini-toletes foram regados com água suficiente para manter a umidade próxima a capacidade de campo, e vinte dias após a data do plantio, foi avaliada a brotação (número de gemas brotadas em relação ao número de gemas plantadas).

Após dez meses da data de plantio, o experimento foi encerrado e realizadas as avaliações, sendo os sacos plásticos abertos com auxílio de uma tesoura e as raízes cuidadosamente lavadas com água, visando a eliminação total do solo do sistema radicular. Procedeu-se à medição da altura das plantas, considerando-se a distância compreendida entre a região da união do tolete com o colmo e a lígula da última folha desenvolvida; e a matéria seca do sistema radicular após a transferência do mesmo para sacos de papel e sua secagem em estufa a 80 °C, onde permaneceram até a obtenção de peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F, ao nível de 1 e 5% de probabilidade, e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SANEST (MACHADO e ZONTA, 1991).

Para a análise estatística dos resultados de brotação das gemas foi utilizado o teste do Qui-Quadrado baseado em 1 ou 2 graus de liberdade, dependendo do fator a

ser analisado e utilizando o nível de 5% de probabilidade como nível crítico para a rejeição da hipótese inicial (CAMPOS, 1983).

**Quadro 1.** Discriminação dos fatores componentes dos 18 tratamentos estudados

<b>Tratamentos</b>	<b>Fatores componentes</b>
1	RB72454 em solo sem tratamento (SST)
2	RB72454 em solo tratado (ST)
3	RB72454 em solo sem tratamento com aplicação de Ethrel (SST/E)
4	RB72454 em solo tratado com aplicação de Ethrel (ST/E)
5	RB72454 em solo sem tratamento com aplicação de Moddus (SST/M)
6	RB72454 em solo tratado com aplicação de Moddus (ST/M)
7	RB85156 em solo sem tratamento (SST)
8	RB85156 em solo tratado (ST)
9	RB85156 em solo sem tratamento com aplicação de Ethrel (SST/E)
10	RB85156 em solo tratado com aplicação de Ethrel (ST/E)
11	RB85156 em solo sem tratamento com aplicação de Moddus (SST/M)
12	RB85156 em solo tratado com aplicação de Moddus (ST/M)
13	RB835486 em solo sem tratamento (SST)
14	RB835486 em solo tratado (ST)
15	RB835486 em solo sem tratamento com aplicação de Ethrel (SST/E)
16	RB835486 em solo tratado com aplicação de Ethrel (ST/E)
17	RB835486 em solo sem tratamento com aplicação de Moddus (SST/M)
18	RB835486 em solo tratado com aplicação de Moddus (ST/M)

#### *3.5.4. Avaliação da aplicação via solo dos fitorreguladores Ethrel e Moddus no desenvolvimento de cana-de-açúcar*

Um segundo experimento foi instalado utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente, diferindo apenas na forma de aplicação e concentração dos

produtos, ou seja, os fitorreguladores foram aplicados sobre os mini-toletes, no momento do plantio, e utilizando-se metade da dose empregada no estudo anterior. Da mesma forma já descrita no item 3.5.3, após o tratamento do substrato, os mini-toletes (um por saco) contendo uma única gema foram cobertos com substrato e umedecidos com água.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 18 tratamentos e quatro repetições por tratamento. Os tratamentos seguiram um esquema fatorial 2x3x3x1, envolvendo dois tratamentos para o solo (SST e ST), três tipos de soluções para pulverização dos mini-toletes (solução de Ethrel, Moddus e água), três variedades de cana-de-açúcar (RB72454, RB855156 e RB 835486) e uma única forma de aplicação, via solo. Os mini-toletes foram regados com água suficiente para manter o solo sempre úmido, e quinze dias após a data do plantio, foi avaliada a brotação (número de gemas brotadas em relação ao número de gemas plantadas). Dez meses após o plantio, o experimento foi encerrado e realizadas as mesmas avaliações e testes estatísticos descritos no item 3.5.3.

### **3.6. Isolamento de rizobactérias de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores**

Dos experimentos descritos nos itens 3.5.3 e 3.5.4 foram coletadas raízes juntamente com o solo aderido, acondicionados em sacos plásticos e transportados para o laboratório onde foram processados imediatamente. Para a seleção *Pseudomonas* fluorescentes, 10 g de solo foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 90 mL de solução salina e agitado durante 15 minutos a 160 rpm para homogeneização da suspensão de solo (MARIANO et al., 2000). A partir destas suspensões, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas no meio de cultura B de King (KING, 1954), sendo as placas incubadas a 28 °C por 48 horas. A seguir, as colônias de bactérias foram estimadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), e aquelas que apresentavam maior fluorescência sob luz com comprimento de onda próximo ao violeta, foram isoladas e transferidas posteriormente para tubos inclinados, sendo estes armazenados a 8 °C.

### 3.7. Antagonismo *in vitro* entre fungos fitopatogênicos e rizobactérias

Os isolados bacterianos obtidos da rizosfera de cana-de-açúcar tratada ou não com fitorreguladores e posteriormente cultivada em solo sem tratamento e com tratamento, após seleção (conforme item 3.6), foram avaliados quanto ao potencial de controle da podridão abacaxi, causada por *Thielaviopsis paradoxa*; podridão de Fusarium, causada por *Fusarium* spp.; e podridão do colo, causada por *Hendersonina sacchari*. As duas primeiras culturas foram gentilmente cedidas pelo Prof. José Abramo Filho e pertencem à coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia Vegetal, CCA/UFSCar. A linhagem utilizada do fungo *Hendersonina sacchari* foi a primeira isolada no Brasil (MENEZHIN, 1997) e está depositada na Fundação André Tosello sob código CCT4755. Estes fungos foram cultivados em meio BDA a 28 °C, por cinco dias e as bactérias em meio B de King na mesma temperatura, por dois dias. O antagonismo foi avaliado em placas de Petri, contendo os mesmos meios de cultura, sendo fungo e bactéria inoculados simultaneamente. Um disco de 5 mm de diâmetro, com crescimento ativo do fungo, foi colocado no centro da placa e a bactéria inoculada em quatro pontos da placa (FREITAS e PIZZINATTO, 1991). As placas foram mantidas a 28 °C, na ausência de luz, por sete dias.

Nos testes de antagonismo realizados em meio B de King e em BDA, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos por isolados, com duas repetições, considerando-se cada placa uma repetição.

A avaliação do antagonismo foi realizada utilizando-se uma escala classificatória de 1 a 5, conforme Martins et al. (2003), modificado, da seguinte forma:

1. Forte antagonismo entre o fungo e a bactéria, com pequeno desenvolvimento do fungo;
2. Forte antagonismo entre o fungo e a bactéria, com grande halo de inibição em torno da colônia bacteriana;

3. Fraco antagonismo, com pequeno halo de inibição ou com o fungo apenas evitando crescer sobre a colônia bacteriana;

4. Nenhum antagonismo, com crescimento fúngico sobre a colônia bacteriana;

5. Antagonismo, com crescimento da bactéria sobre a colônia do fungo, o qual não se desenvolve.

Como controles, foram utilizadas placas de Petri com ambos os meios, sendo que apenas o fungo foi colocado para crescimento, a 28° C, na ausência de luz, por sete dias.

### **3.8. Teste de promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação**

Alguns isolados selecionados no teste de antagonismo in vitro foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar. Os isolados selecionados foram cultivados em meio B de King líquido com agitação de 160 rpm a 28 °C, por 48 horas. Para as inoculações, as concentrações das suspensões bacterianas foram determinadas pela comparação com a escala de McFarland e ajustadas para aproximadamente  $10^8$  células/mL. À cada suspensão, foi adicionada solução de Tween 80 (MARIANO et al., 2000).

Colmos de cana-de-açúcar da variedade RB72454 com dez meses de idade foram partidos em mini-toletes contendo uma gema. Após lavagem superficial em água, os mesmos foram imersos em meio B de King líquido contendo culturas (puras) dos isolados bacterianos, por cinco minutos. Foi também preparada uma amostra testemunha, a qual foi imersa em meio King B líquido (sem crescimento bacteriano), também por cinco minutos.

A seguir, os colmos foram plantados em vasos plásticos com capacidade para 2 litros de solo, esterilizados previamente em autoclave (por tindalização), a 120 °C por duas horas, três dias consecutivos. Noventa dias após a data do plantio, o experimento foi encerrado.

A avaliação do crescimento das plantas em presença das bactérias foi baseada na brotação, na altura das plantas e no peso da matéria seca do sistema radicular e parte aérea, conforme descritos anteriormente. A partir dos dados obtidos calculou-se o índice de aumento (IA) para todas as variáveis analisadas, através da fórmula proposta por Edginton et al. (1997) apud Santos et al. (2005):

$$IA (\%) = (Tr-Test)/Test \times 100, \text{ onde,}$$

Tr = valor obtido para o tratamento, e  
Test = valor obtido para a testemunha.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, constituído por seis isolados (Ps86, Ps109, Ps1632, Ps1634, Ps1635 e Ps1691) e o controle, sem bacterização, todos com dez repetições.

### **3.9. Antagonismo in vivo de isolados de rizobactérias contra *Thielaviopsis paradoxa***

Os isolados Ps1575, Ps1631, Ps1632, Ps1635 e Ps109 de rizobactérias foram cultivados em meio B de King líquido, com agitação de 160 rpm a 28 °C, por 48 horas. Em seguida, as concentrações bacterianas foram ajustadas para 10<sup>8</sup> células/mL utilizando-se a escala de McFarland. As suspensões bacterianas foram depositadas em bandejas plásticas onde adicionou-se solução de Tween 80. Toletes contendo três gemas da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, considerada suscetível a *Thielaviopsis paradoxa*, após passarem por uma lavagem superficial em água, foram imersos nessas suspensões, por 30 minutos. Em seguida, foram secos por 12 horas sobre folhas de papel e inoculados com o fungo.

Para a obtenção do inóculo, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de BDA a 28 °C, por sete dias. Adicionou-se água destilada esterilizada e com auxílio de uma lâmina de vidro raspou-se a superfície do meio. Filtrou-se a suspensão obtida em gaze, sendo os conídios contados em um hemacitômetro, ajustando-se para uma concentração final de 10<sup>6</sup> conídios por mL (SCALOPPI et al., 2003).

O inóculo foi acondicionado em um borrifador de água doméstico, e procedeu-se a inoculação de ambas as extremidades dos toletes. Estes foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em incubadora a 25 °C. O delineamento empregado foi de blocos ao acaso com seis tratamentos (cinco isolados e uma testemunha) e oito repetições.

O controle da doença (podridão abacaxi) foi avaliado quinze dias após a data de inoculação, quando cada colmo foi seccionado longitudinalmente, para avaliação dos sintomas internos. O percentual de controle da doença foi interpretado como a quantidade de tecido afetado pelo fungo (cm), em relação à quantidade total de tecido vegetal inoculado (cm). Foi também realizado um tratamento testemunha, isto é, o tolete não foi tratado com a rizobactéria e foi inoculado com o fitopatógeno.

### **3.10. Estudo dos mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento**

#### *3.10.1. Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA)*

A produção de ácido indol acético (AIA) foi determinada utilizando-se a técnica descrita por Bric et al. (1991). As bactérias foram inoculadas em placas de Petri em meio Luria-Bertani Ágar suplementado. As placas, após inoculação das bactérias, foram cobertas com papel de filtro Whatman nº 1 e incubadas a 28 °C, por 24 horas. Em seguida, o papel foi removido e tratado com 10 mL do reagente de Salkowski (GORDON e WEBER, 1951). A reação foi mantida a temperatura ambiente (+/- 28 °C) por 10 minutos e a produção de AIA foi identificada pela formação de halo vermelho na membrana imediatamente ao redor da colônia.

#### *3.10.2. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico*

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato foi realizada em meio de BDYA acrescido de fosfato inorgânico (SPERBER, 1958). As bactérias foram

inoculadas no meio de cultura e as placas incubadas a 28 °C, por 48 horas, sendo a formação de uma zona clara ao redor da colônia indicativo de solubilização de fosfato.

### *3.10.3. Seleção de bactérias produtoras de ácido cianídrico (HCN)*

A seleção de bactérias produtoras de ácido cianídrico (HCN) foi realizada em meio de Tryptic Soy Agar suplementado (WEI et al., 1991). As bactérias foram inoculadas no meio de cultura, sendo colocadas tiras de papel de filtro impregnado com solução de ácido pícrico na tampa das placas de Petri. As placas foram seladas com *Parafilm* e incubadas a 28 °C, por quatro dias. A produção de HCN foi evidenciada pela mudança de coloração do papel de filtro, de amarelo cítrico para laranja ou marrom.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito da adição de fitorreguladores sobre a comunidade microbiana do solo

Os resultados acerca do efeito dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre a comunidade microbiana do solo estão apresentados nas Figuras de 1 a 8 e Tabelas 2 a 5. Foi avaliado o número de unidades formadoras de colônias (UFC g<sup>-1</sup> de solo seco) de fungos, bactérias, actinomicetos e *Pseudomonas* spp., a partir de diluições em série e plaqueamentos nos meios de cultura Martin, Agar Nutriente Agar, Agar Alcalinizado e B de King respectivamente, acrescidos dos fitorreguladores em concentrações variando de 0 a 1000 ppm.

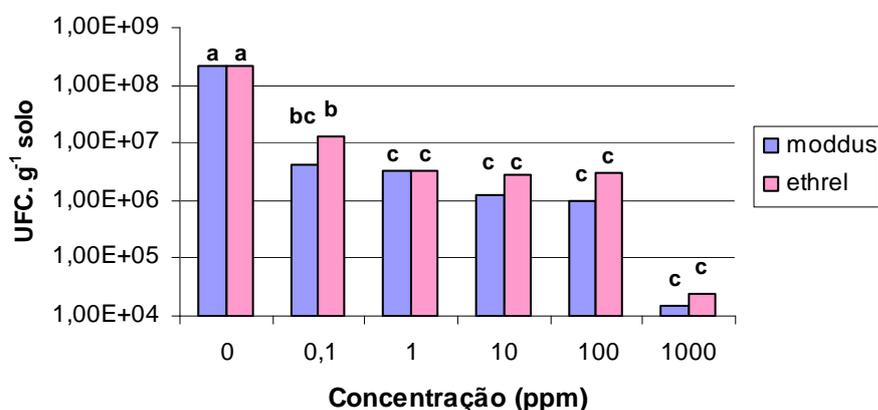
Para a população de fungos, os resultados da análise de variância, mostraram que há diferença estatisticamente significativa entre as concentrações dos fitorreguladores, porém não significativa entre os fitorreguladores Ethrel e Moddus (Tabela 2, Figura 1).

Não foram encontrados estudos acerca dos efeitos do fitorregulador Moddus e poucos trabalhos sobre Ethrel na comunidade microbiana do solo, entretanto, muitos estudos relataram que o uso de herbicidas (TUFFI SANTOS et al., 2005, CASTRO JUNIOR et al., 2006; FERREIRA et al., 2006), fungicidas (SILVA et al. 2005) e pesticidas (SANTOS e MONTEIRO, 1994) causa aumento ou decréscimo no número, da diversidade e da atividade de microrganismos, modificando o equilíbrio biológico do solo e provocando o aparecimento de doenças ou eliminando as já existentes.

**Tabela 2.** Análise de variância para o número de UFC de fungos.g<sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.

Fontes de Variação	Valor de F
Concentrações	5.682,1 **
Fitorreguladores	4,47 <sup>n.s</sup>
Concentrações X Fitorreguladores	2,009 <sup>n.s</sup>
Coeficiente de Variação (%) = 5,98	

\*\*,\* significativo a 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo Teste F; **n.s.** não significativo.



**Figura 1.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de fungos do solo (UFC. g<sup>-1</sup> solo seco). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.

Observou-se que, tanto a adição de Ethrel quanto de Moddus diminuiu o número de fungos do solo, quando comparado com o tratamento controle (0 ppm), não sendo detectadas diferenças entre os produtos. Constatou-se que os produtos têm efeito negativo sobre os fungos, com inibição até mesmo na concentração mais baixa (0,1 ppm), e que de 1 até 1000 ppm, os números de UFC g<sup>-1</sup> solo não diferiram estatisticamente entre si (Figura 1). Os dados são concordantes com os relatados por Santos e Monteiro (1994), que após revisão da literatura, relataram que, de um modo geral, os fungos são mais sensíveis à ação de pesticidas que outros grupos de microrganismos, sendo o seu número drasticamente reduzido após a aplicação destas

substâncias. Em relação ao Ethrel, alguns trabalhos têm demonstrado sua ação fungistática no solo (SMITH, 1980), onde baixas concentrações têm inibido o crescimento de fungos (MACEDO E CHIBA, 1985; MACEDO E AZEVEDO, 1990), inclusive de muitos patogênicos como *Alternaria tenuis*, *Cladosporium lignicolum*, *Trichoderma lignorum* e *Fusarium culmorum* para raízes de plantas de trigo (MICHNIEWICZ e CZERWINSKA, 1991), e *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum* e *Verticillium* patógenos causadores de várias doenças em algodão (MILLIKAN E FIELDS, 1964; MACEDO et al., 1984).

Estudos *in vitro* relataram que muitos herbicidas, entre eles Trifluralina, Diuron e Metolachlor foram eficientes em diminuir o desenvolvimento dos patógenos, tais como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gossipi* e *Verticillium albo-atrum* (MACEDO et al., 1984; MACEDO e CHIBA, 1985; MACEDO e AZEVEDO, 1990). Em campo, a aplicação de Diuron reduziu a incidência e severidade da podridão de raízes caudada por *Cercospora herpotrichoides* (HUBER et al. 1966) .

No presente estudo não foram realizadas técnicas para identificação dos principais gêneros, porém não foram constatadas diferenças morfológicas das colônias entre os diferentes tratamentos (Figura 2). Santos e Monteiro (1994), estudando o efeito da aplicação dos pesticidas Aldicarbe (nematicida) e Endosulfan (inseticida) constataram que, embora não tenham ocorrido diferenças quantitativamente significativas nos fungos, ocorreram mudanças qualitativas, com predomínio de *Penicillium* e *Trichoderma*, dados que também foram observados por Parr (1981).



**Figura 2.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de fungos do solo, em meio de Martin, incubação a 28 °C, por 48 horas.

Há indicações de que os herbicidas também estimulam a comunidade de organismos antagônicos, diminuindo a de patógenos, conforme constatado por Curl et al. (1968) citado por Macedo e Azevedo (1990), onde *Sclerotium rolfsii* sofreu inibição devido ao seu antagônico *Trichoderma viride* ter sido estimulado pelo tratamento do solo com Simazina.

A aplicação de Ethrel libera etileno, o qual funciona como hormônio de crescimento exógeno, que por sua vez age como indutor de defesa em diferentes espécies vegetais (BLECKER e DENDE, 2000). O tratamento de plantas de oliveira com Ethrel reduziu a postura de ovos da praga *Prays oleae* (RAMOS e RAMOS, 1989), não afetando seus inimigos naturais, podendo desta forma substituir os inseticidas utilizados para a cultura (ROSALES et al., 2006).

Com relação à comunidade bacteriana, os resultados da análise de variância mostraram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações, entre os fitorreguladores e para a interação entre eles (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise de variância para o número de UFC de bactérias por g<sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.

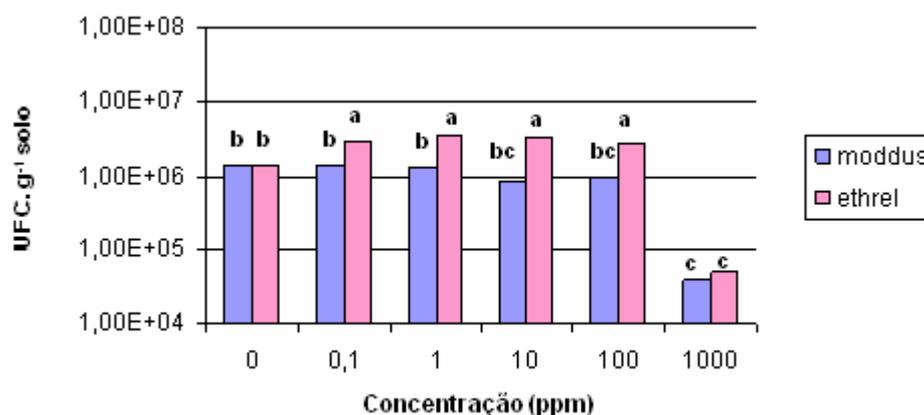
Fontes de Variação	Valor de F
Concentrações	32,96 **
Fitorreguladores	122,25 **
Concentração X Fitorreguladores	13,20 **
Coeficiente de Variação (%) = 18,23	

\*\*, significativo a 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo Teste F.

Pode-se ver na Figura 3 que o número de UFC de bactérias por g<sup>-1</sup> de solo não foi afetado pela adição de Moddus, diferentemente do resultado obtido com Ethrel, onde os valores tiveram aumentos estatisticamente significativos nas concentrações de 0,1 a 100 ppm, comparando-se com os resultados observados no controle. Na dose de 1000 ppm, porém, os números foram significativamente inferiores àqueles do tratamento controle e das demais doses empregadas, com inibição igual tanto para Moddus quanto para Ethrel (Figura 3).

Para Moddus, os valores de UFC de bactérias por g<sup>-1</sup> solo para o tratamento controle não diferiram estatisticamente dos demais até a concentração de 100 ppm. A

1000 ppm, entretanto, houve uma redução significativa, como anteriormente já mencionada (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de bactérias do solo (UFC.g<sup>-1</sup> solo seco). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.

Com o fitorregulador Ethrel, houve aumento estatisticamente significativo no número de bactérias nas concentrações de 0,1 até 100 ppm, mostrando que esse grupo de microrganismos provavelmente utilizou o Ethrel como fonte de nutrientes e energia (Figuras 3 e 4). O mesmo efeito foi observado por Moretini (2000) e Monkiedje et al. (2002) citados por Silva et al. (2005), onde a aplicação do fungicida Metalaxil aumentou o número de bactérias do solo, por tratar-se de fonte de carbono para alguns dos seus grupos, ou por causar a liberação de outras formas de nutrientes. No entanto o efeito benéfico de Moddus foi dependente da concentração, pois na maior dose, de 1000 ppm, houve significativa redução do número de colônias (Figuras 3 e 4).

Embora não se tenha feito identificação das bactérias, notou-se que as colônias apresentavam características morfológicas semelhantes em todos os tratamentos, sugerindo não haver espécies predominantes em nenhum dos produtos utilizados (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de bactérias do solo, em meio de Agar Nutriente, incubação a 35 °C, por 24 horas.

Vários estudos têm demonstrado que as bactérias podem resistir (DROBY e COFFEY, 1991) e até proliferar na presença de agrotóxicos (MORETINI, 2000), mesmo em concentrações elevadas (MARTESSON, 1992). Porém, Santos e Monteiro (1994), estudando o efeito de dois inseticidas sobre a microbiota do solo, nematicida e acaricida Aldicarbe e o acaricida Endosulfan verificaram que a aplicação de Endosulfan resultou em mudanças significativas no número de colônias de bactérias, enquanto o Aldicarbe ocasionou drástica redução nas concentrações de 2 e 20 ppm de bactérias e fungos. Maly et al. (2006) estudando o efeito de glifosato sobre estirpes de rizóbio *in vitro*, mostraram que o produto era inibitório ao crescimento das bactérias; seu efeito era maior com o aumento da concentração aplicada e que as diferentes estirpes estudadas responderam diferentemente ao produto.

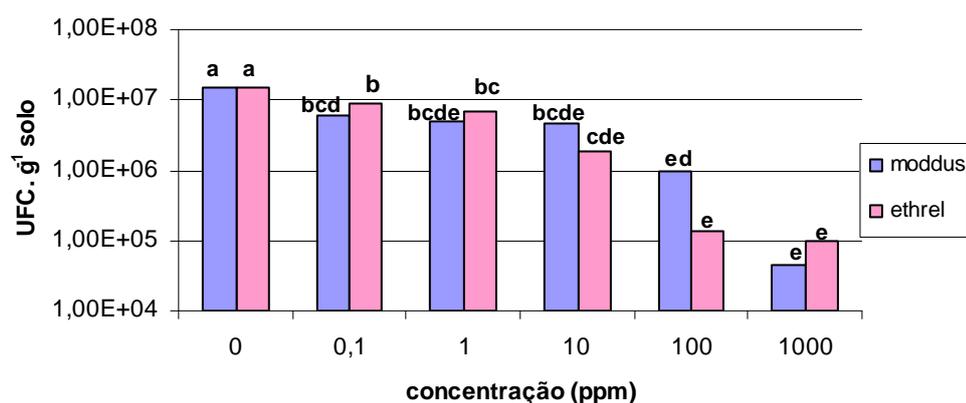
Semelhantemente ao observado para fungos, o número de actinomicetos diferiu significativamente entre as concentrações de fitorreguladores, mas não entre fitorreguladores e na interação entre concentrações e fitorreguladores (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise de variância para o número de UFC de actinomicetos.g<sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.

Fontes de Variação	Valor de F
Concentrações	70,48 **
Fitorreguladores	0,24 <sup>n.s</sup>
Concentrações X Fitorreguladores	2,27 <sup>n.s</sup>
Coeficiente de Variação (%)	24,85

\*\* significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo Teste F; **n.s.** não significativo.

Pode-se observar na Figura 5 que o número de actinomicetos foi reduzido com a aplicação de ambos os produtos e os efeitos foram dependentes da concentração utilizada. Os resultados obtidos não estão de acordo com aqueles encontrados por Santos e Monteiro (1994) e Araújo et al, 2003, onde o número de actinomicetos foi estimulado na presença de pesticidas e herbicidas.



**Figura 5.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de actinomicetos do solo (UFC.g<sup>-1</sup> solo). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.

Quanto ao número de *Pseudomonas*, os resultados de análise de variância mostraram haver diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, tipo de fitorreguladores e para interação entre eles (Tabela 5).

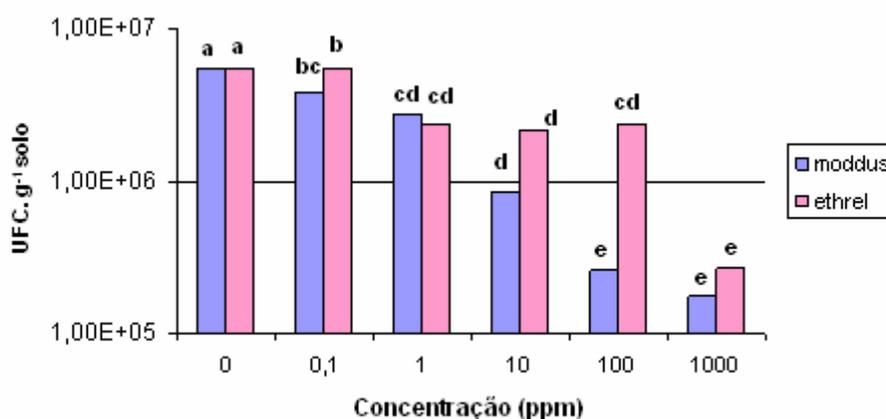
**Tabela 5.** Análise de variância para o número de UFC de *Pseudomonas*.g<sup>-1</sup> solo seco em função de diferentes concentrações dos fitorreguladores Ethrel e Moddus.

Fontes de Variação	Valor de F
Concentrações	200,212 **
Fitorreguladores	19,181 *
Concentrações X Fitorreguladores	14,123 **
Coeficiente de Variação (%) = 32,3	

\*\*, \* significativo a 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente pelo Teste F.

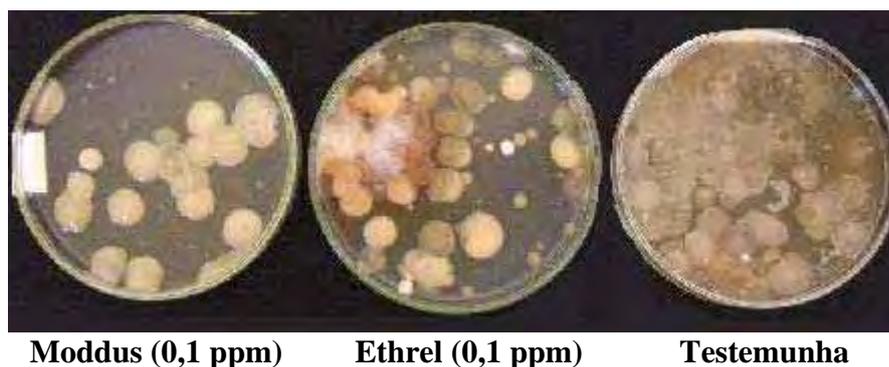
Como pode ser observado na Figura 6, houve alteração do número de UFC de colônias de *Pseudomonas* spp. com a aplicação dos fitorreguladores. Essa inibição iniciou-se com a adição da menor dose (0,1 ppm) ao meio de cultura e à medida que as concentrações dos fitorreguladores aumentaram, foram verificados maiores decréscimos dos números de UFC deste gênero.

Para o Moddus, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as doses de 0,1 e 1 ppm, mas ambas diferiram da testemunha e dos tratamentos com 100 e 1000 ppm. Quanto à morfologia das colônias, notou-se uma seleção dos isolados com o aumento da dosagem. Foram verificadas colônias com uniformidade morfológica, apresentando-se esféricas, convexas e mucosas e com coloração amarelo-esverdeado. Verificou-se também modificação da coloração do meio de cultura, provavelmente pela liberação de compostos produzidos pelos microrganismos (Figura 7).



**Figura 6.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de *Pseudomonas* do solo (UFC.g<sup>-1</sup> solo). Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 5% de significância.

Para o Ethrel, o tratamento com 0,1 ppm diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, as concentrações de 1, 10 e 100 ppm não diferiram entre si, mas diferiram em relação à 1000 ppm, onde se observou redução mais acentuada do número de colônias. Quanto à morfologia das colônias, foi detectada alguma diferença entre os isolados obtidos do tratamento testemunha e com Ethrel (Figura 7).



**Figura 7.** Efeito da adição dos fitorreguladores Ethrel e Moddus sobre o número de *Pseudomonas* spp. no meio de B de King, incubação a 28 °C, por 48 horas.

#### **4.2. Avaliação do efeito de fitorreguladores em cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação**

##### *4.2.1. Efeito residual da aplicação de fitorreguladores via foliar*

Os resultados obtidos para os parâmetros brotação de gemas, altura e matéria seca de raízes encontram-se apresentados nas Tabelas 6 a 12 e Figuras 8 a 10.

Ao analisar o efeito dos fitorreguladores aplicados em três variedades de cana-de-açúcar 40 dias antes do corte dos colmos para utilização como mudas, constatou-se para o parâmetro brotação de gemas que não houve diferença estatística significativa em relação às variedades, tratamento do solo e aos produtos utilizados (Tabelas 6, 7 e 8). Esses resultados não estão de acordo com aqueles apresentados por Campos (1963), Melloto et al. (1987) e Paggiaro (1992) os quais observaram que a utilização dos fitorreguladores estimulou a brotação das gemas tratadas, quando comparados com o tratamento controle.

**Tabela 6.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator variedades.

Variedades	Sem brotação	Com brotação	Totais
RB72454	3	21	24
RB835486	10	14	24
RB855156	2	22	24
Totais	15	57	72

$$\chi^2_{(1)}=5,39 \text{ (n.s); n.s.= não significativo}$$

**Tabela 7.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator solo.

Solos	Sem brotação	Com brotação	Totais
Sem tratamento	9	27	36
Com tratamento	6	30	36
Totais	15	57	72

$$\chi^2_{(2)}=0,76 \text{ (n.s); n.s.= não significativo}$$

**Tabela 8.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator fitorreguladores.

Fitorreguladores	Sem brotação	Com brotação	Totais
Ethrel	6	18	24
Moddus	2	22	24
Testemunha	7	17	24
Totais	15	57	72

$$\chi^2_{(2)}=3,53 \text{ (n.s); n.s.= não significativo}$$

Para a variável altura das plantas em condições de casa-de-vegetação durante um período de oito meses, os resultados da análise de variância mostraram haver diferença estatisticamente significativa em relação aos fitorreguladores, variedades, solo e para a interação (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise de variância para altura (cm) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via foliar.

Fontes de variação	GL	QM	F
Variedades	2	17696,0575	208,37 **
Fitorreguladores	2	720,0270	8,47 **
Solo	1	5959,7975	70,17 **
Varied. X Fitor.	4	79,2875	0,93 <sup>ns</sup>
Varied X Solo	2	990,5534	11,66 **
Fitor. X Solo	2	100,2124	1,18 <sup>ns</sup>
Varied. X Fitor. X Solo	4	34,0929	0,40 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	84,9249	

Coefficiente Variação (%)= 7,33

\*\* significativo a 1%; **n.s.** não significativo

As plantas cultivadas em solo tratado com brometo de metila apresentaram altura significativamente superior, quando comparada àquela das plantas cultivadas em solo sem tratamento (Tabela 10). Com o tratamento do solo, os microrganismos são destruídos, inclusive alguns patogênicos, tornando o solo mais fértil por algum período de tempo, o que promove o crescimento das plantas. Isso ocorre devido à liberação de nutrientes presentes no protoplasma microbiano que se tornam disponíveis para as plantas devido à morte dos microrganismos (BURGES, 1960; ROVIRA e DAVEY, 1971; MILLHOUSE e MUNNECKE, 1979). Também se atribui a este maior desenvolvimento a rápida recomposição da população microbiana por microrganismos benéficos, como por exemplo, as bactérias *Pseudomonas* (GAMLIEL e KATAN, 1991). Este gênero e alguns outros isolados da rizosfera de plantas de diversas culturas têm demonstrado efeito na promoção de crescimento, devido ao fornecimento de compostos que atuam como reguladores de crescimento ou que facilitam a absorção de nutrientes.

**Tabela 10.** Altura (cm) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado com brometo de metila (ST).

Variedades	SST	ST	Média Variedade
RB72454	149,00 aB	156,55 aA	152,77 a
RB835486	123,44 bB	142,00 bA	132,72 b
RB855156	72,83 cB	109,75 cA	91,29 c
Média Solo	115,09 B	136,10 A	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as minúsculas para comparação entre variedades e maiúsculas entre os tratamentos dos solos.

Independentemente do tratamento do solo, a variedade RB72454 foi a que apresentou maior altura, seguida pela variedade RB835486 e, por fim, da RB855156, no mesmo período de crescimento. Comparando-se, porém, os valores determinados em solo sem tratamento e solo tratado, observou-se que a variedade RB855156 foi aquela mais favorecida com o tratamento do solo, ou seja, apresentando uma altura 50,7% superior àquela apresentada pelas plantas cultivadas em solo sem tratamento, enquanto que para as variedades RB835486 e RB72454, estes aumentos foram de 15,0 e 5,0% respectivamente (Tabela 10). Resultados que serão apresentados mais adiante, mostraram maior número de UFC de *Pseudomonas* na rizosfera da variedade RB855156 em solo com tratamento.

A aplicação dos fitorreguladores Moddus e Ethrel reduziu a altura das plantas, comparando-se com aquela verificada nas plantas controle (Tabela 11), sendo o Moddus o regulador vegetal com maior ação na redução da altura das plantas.

**Tabela 11.** Altura de planta (cm) de variedades de cana-de-açúcar que tiveram prévia aplicação de fitorreguladores via foliar.

Fitorreguladores	Altura (cm)
Moddus	120,17 c*
Ethrel	124,07 b
Testemunha	132,54 a

\* Letras distintas indicam médias com diferenças estatísticas a 1% de significância.

Esses fitorreguladores são utilizados em cana-de-açúcar, como já mencionados anteriormente, para acelerar a maturação. O Moddus é um inibidor da giberelina, que reduz acentuadamente o ritmo de crescimento da planta, fazendo com que ela acumule mais sacarose, em vez de utilizá-la como fonte de energia para seu crescimento vegetativo. O Ethrel não reduz o ritmo de crescimento da planta, porém libera etileno promovendo o acúmulo de sacarose nos colmos. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com aqueles observados em soja, onde o ethephon (Ethrel) inibiu o crescimento das plantas em relação à testemunha (CAMPOS et al., 2007) e com trigo, ambos os experimentos conduzidos no Rio Grande do Sul, onde o Moddus foi o regulador vegetal com maior ação na redução da altura das plantas (RODRIGUES et al., 2003). Cabe salientar que estes valores são resultados da aplicação direta do produto nas plantas, enquanto que neste estudo os dados se referem aos efeitos residuais dos produtos.

Outros reguladores de crescimento têm sido utilizados com sucesso como retardadores de crescimento. A aplicação de Daminozide (4000 ppm) em amendoizeiro reduziu a altura das plantas (CASTRO e APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 1993) e os cloretos de Clormequat e de Mepiqua reduziram a altura das plantas de algodoeiro, e conseqüentemente aumentaram a produtividade da cultura (LAMAS, 2007).

Quanto à matéria seca de raízes, a análise de variância mostrou diferenças significativas em relação às variedades, fitorreguladores, solo e interações entre variedades e fitorreguladores, fitorreguladores e solo, e solo e variedades (Tabela 12). Os efeitos da aplicação dos fitorreguladores sobre a matéria seca de raízes estão apresentados nas Figuras 8 a 10. Observa-se que as variedades responderam diferentemente à aplicação dos fitorreguladores. Para a variedade RB855156, somente a aplicação de Moddus proporcionou incrementos significativos na massa seca de raízes, sendo este valor 54,5% superior ao determinado para a testemunha (Figura 8). Para a variedade RB835486, as aplicações de ambos os fitorreguladores inibiram significativamente o desenvolvimento do sistema radicular, enquanto que para a variedade RB72454, Moddus e Ethrel foram eficientes em promover o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues (1995), que constatou que vários fatores interferem na eficiência dos

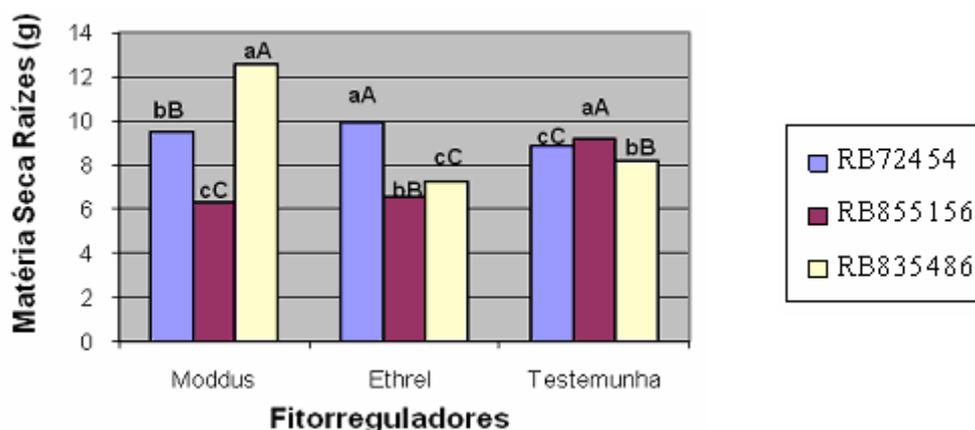
fitorreguladores, sendo a variedade um deles, uma vez que cada variedade apresenta estímulos naturais de resposta ao fitorregulador, em função do seu potencial genético

**Tabela 12.** Análise de variância para matéria seca de raízes (g) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação prévia de fitorreguladores via foliar na muda.

Fontes de variação	GL	QM	F
Variedades	2	25,4438	8,65 *
Fitorreguladores	2	10,7488	3,65 *
Solo	1	70,9597	24,12 **
Varied. X Fitor.	4	27,7469	9,43**
Varied X Solo	2	23,1990	7,88 **
Fitor. X Solo	2	13,5674	4,61 **
Varied. X Fitor. X Solo	4	5,5682	1,89 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	2,9414	

Coeficiente de Variação (%)= 7,23

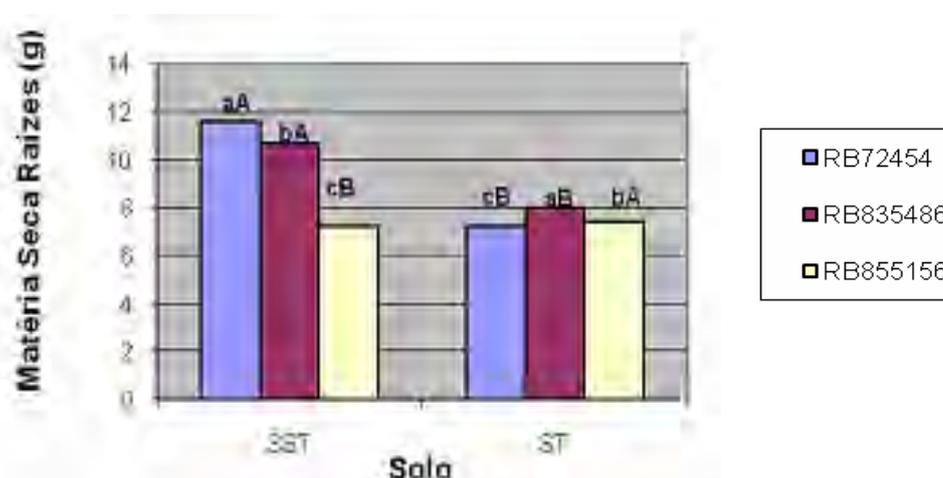
\*\* significativo a 1% e \* significativo a 5%; **n.s.** não significativo



**Figura 8.** Matéria seca de raízes das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar com aplicação prévia dos fitorreguladores Ethrel e Moddus via foliar na muda. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.

A utilização de tratamento para o solo (desinfecção e desinfestação com brometo de metila) implicou em significativa diferença na média geral para matéria seca do sistema radicular, sendo que para este parâmetro, o cultivo em solo sem tratamento apresentou valores significativamente superiores àquele com tratamento (Figura 9).

Em solo sem tratamento, as variedades RB72454 e RB835486 apresentaram valores de matéria seca de raízes 60% e 32,3% superiores, respectivamente, quando comparado àqueles obtidos em solo com tratamento (Figura 9).



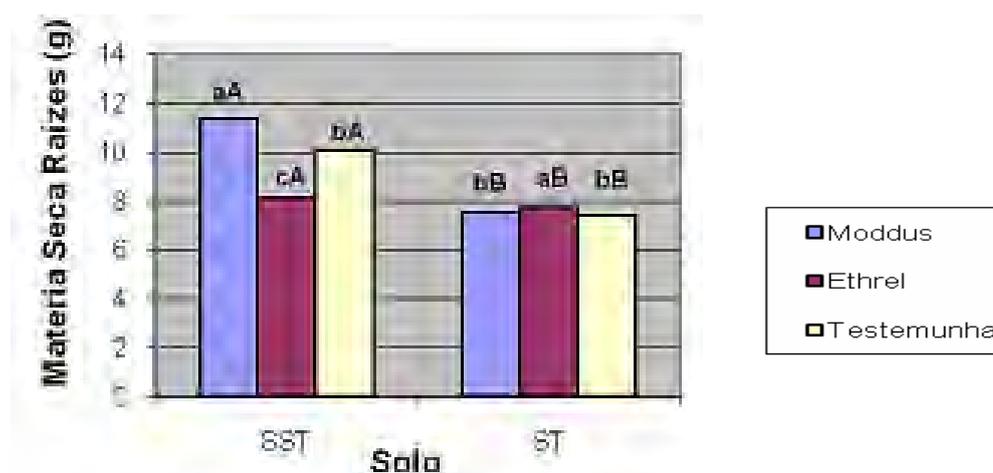
**Figura 9.** Matéria seca de raízes (g) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado (ST). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.

A variedade RB855156 apresentou comportamento diferente das demais, ou seja, para esta houve incremento significativo na matéria seca de raízes de apenas 1,9%, em solo tratado. French e Herbert (1980) e Venâncio et al. (2006) relataram que o tratamento do solo com brometo de metila controla todos os organismos vivos, eliminando insetos, nematóides, bactérias e fungos, tanto os patogênicos quanto os sapróbios. A ausência desta microbiota do solo tem um efeito sobre as plantas, uma vez que os microrganismos são responsáveis pela decomposição e mineralização da matéria orgânica, fixação biológica de nitrogênio, nitrificação, amonificação, agregação e

estabilidade de agregados, simbioses com fungos micorrízicos, produção de enzimas e vitaminas. As plantas cultivadas em presença de microrganismos absorvem maiores quantidades de nutrientes quando comparadas àquelas cultivadas em condições estéreis (BARBER et al., 1975 citados por MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Associada a isto, a aplicação de fitoreguladores via foliar modifica o metabolismo vegetal, ocasionando aumento na quantidade e qualidade de seus exsudatos. Isto pode favorecer determinados grupos de microrganismos que respondem mais prontamente à adição de aminoácidos, açúcares solúveis etc. A utilização de fitoreguladores em cana-de-açúcar objetiva inibir o crescimento vegetativo e como consequência aumentar o acúmulo de sacarose nos colmos, mas a sua aplicação via foliar e a utilização de seus colmos como mudas poderá ser utilizada também como uma alternativa para aumentar a produtividades das plantas, especialmente em ambientes caracterizados por baixa disponibilidade de água e nutrientes, onde um sistema radicular bem desenvolvido é o aspecto fundamental da produtividade.

Considerando os tratamentos de solo, para SST, a aplicação de Moddus foi superior à testemunha, proporcionando incrementos significativos de 13,13%. No solo tratado, o Ethrel proporcionou incrementos na massa seca de raízes na ordem de 2,25% em relação à testemunha (Figura 10).



**Figura 10.** Matéria seca de raízes (g) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 cultivadas em solo sem tratamento (SST), com tratamento (ST) e com aplicação prévia dos fitoreguladores Ethrel e Moddus via foliar na muda. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as letras minúsculas para comparação dentro do tratamento, e maiúsculas entre os tratamentos.

Nas condições em que o experimento foi realizado, os resultados podem ser resumidos da seguinte forma: os efeitos dos fitorreguladores dependeram principalmente da variedade de cana-de-açúcar, em concordância ao que é relatado por Silva et al.(2007) . As plantas que receberam aplicação dos fitorreguladores, seja ele Moddus ou Ethrel, e que foram utilizadas como mudas, apresentaram efeito residual dos produtos, pois as mesmas apresentaram alturas inferiores quando comparada à altura de plantas que não foram tratadas, sendo o Moddus o produto que mais interferiu neste parâmetro.

Para a matéria seca do sistema radicular, as variedades responderam diferentemente, pois a RB72454 teve seu sistema radicular melhor desenvolvido com a aplicação de ambos os produtos; já com a RB855156, apenas com a aplicação do Moddus; e para RB835486, nenhum dos produtos proporcionou incremento no sistema radicular nos diferentes tratamentos aqui utilizados.

#### *4.2.2. Aplicação de fitorreguladores via solo*

Os resultados obtidos para os parâmetros brotação de gemas, altura e matéria seca de raízes encontram-se apresentados nas Tabelas 13 a 18 e Figuras 11 e 12.

A análise estatística para o parâmetro brotação de gemas revelou diferença significativa entre as variedades, ou seja, a porcentagem de brotação foi maior para a variedade RB855156, seguida pela variedade RB72454 e RB835486 (Tabela 13). Para o tratamento do solo e para a aplicação de fitorreguladores, não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Tabelas 14 e 15).

**Tabela 13.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator variedades.

Variedades	Sem brotação	Com brotação	Totais
RB72454	6	18	24
RB835486	15	9	24
RB855156	1	23	24
Totais	22	50	72

$$\chi^2_{(2)} = 19,82 \text{ **}; \text{ **} = \text{significativo } 1\%$$

**Tabela 14.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator solo.

Solos	Sem brotação	Com brotação	Totais
Sem tratamento	9	27	36
Com tratamento	13	23	36
Totais	22	50	72

$$\chi^2_{(1)} = 1,14 \text{ (n.s)}; \text{ n.s.} = \text{não significativo}$$

**Tabela 15.** Utilização do teste do Qui-Quadrado para análise de frequência de brotação para o fator fitorreguladores.

Fitorreguladores	Sem brotação	Com brotação	Totais
Ethrel	6	18	24
Moddus	2	22	24
Testemunha	7	17	24
Totais	15	57	72

$$\chi^2_{(1)} = 1,78 \text{ (n.s)}; \text{ n.s.} = \text{não significativo}$$

Quanto à altura das plantas, tratamentos como variedades, fitorreguladores e solo, bem como as interações entre variedades e fitorreguladores; variedades e solo; e variedades, solo e fitorreguladores, influenciaram significativamente as médias de altura das plantas, como mostra a Tabela 16.

**Tabela 16.** Análise de variância para altura (cm) de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via solo.

Fontes de variação	GL	QM	F
Variedades	2	10813,7276	72,98**
Fitorreguladores	2	987,5942	6,66**
Solo	1	5788,7628	39,06**
Varied. X Fitor.	4	437,5308	2,95*
Varied X Solo	2	1140,5551	7,69**
Fitor. X Solo	2	67,5163	0,45 <sup>ns</sup>
Varied. X Fitor. X Solo	4	716,2170	4,83**
Resíduo	36		

Coefficiente de variação (%) = 9,71

\*\* significativo a 1%; \* significativo 5%; **n.s.** não significativo

Na média geral, as plantas cultivadas em solo tratado apresentaram maiores desenvolvimentos em altura (16,5% em média) quando comparados com os valores obtidos no solo sem tratamento (Tabela 17). Houve aumento na altura das plantas de 2,9, 16,9 e 42,5%, respectivamente, para as variedades RB835486, RB72454 e RB855156, quando o solo foi tratado com brometo de metila (Tabela 17).

Independentemente do tratamento do solo, observou-se que houve diferença significativa em altura entre as variedades estudadas, sendo a RB72454 a variedade mais alta, seguida pela RB835486 e, finalmente RB855156 (Tabela 17).

**Tabela 17.** Altura (cm) de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (SST) e tratado com brometo de metila (ST).

Solo	Variedades	Altura(cm)	Média (cm)
SST	RB72454	137,57 aB	114,99 B
	RB835486	124,77 bB	
	RB855156	82,63 cB	
ST	RB72454	160,83 aA	134,03 A
	RB835486	128,44 bA	
	RB855156	117,83 cA	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de significância, sendo as minúsculas para comparação entre variedades e maiúsculas entre os solos.

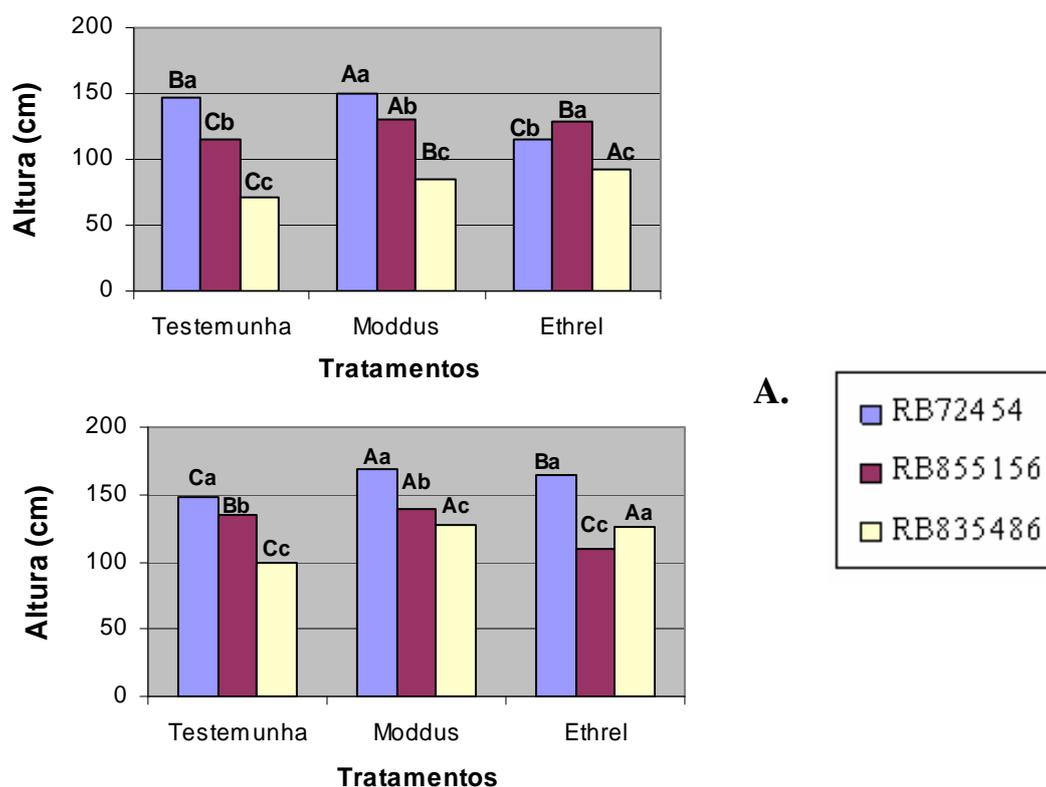
Em solo sem tratamento (Figura 11), ocorreram diferenças significativas entre as médias das alturas nos tratamentos com fitorreguladores para uma mesma variedade. Para RB72454, a utilização de Moddus proporcionou maior altura das plantas, e com Ethrel, a altura foi inferior àquela da testemunha (Figura 11). Para a variedade RB855156, a altura média das plantas tratadas com fitorreguladores foi superior àquela obtida com a testemunha, sendo que entre os fitorreguladores, o Moddus foi mais eficiente para promover crescimento.

Para a variedade RB835486, à semelhança do que ocorreu com a RB855156, a aplicação de fitorreguladores proporcionou incrementos na altura das plantas, sendo o Ethrel ainda mais eficiente do que o Moddus. Em solo tratado (Figura 11), observou-se diferença significativa em altura entre as variedades estudadas.

Dentro do tratamento testemunha, a variedade RB72454 foi a mais alta, seguida pela RB855156 e pela RB835486, esta última a mais baixa. As variedades responderam diferentemente à aplicação dos fitorreguladores, sendo que para a variedade RB72454, tanto Ethrel quanto Moddus proporcionaram incrementos na altura das plantas em 11,64% e 14,88 %, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 11).

Para a variedade RB855156, a altura média das plantas tratadas foi superior apenas com Moddus. Valores intermediários foram obtidos no tratamento testemunha, e as menores médias para as plantas tratadas com Ethrel. Para a variedade RB835486, à semelhança do que ocorreu com a variedade RB72454, a aplicação dos fitorreguladores proporcionou incrementos na altura das plantas tratadas, quando comparada com as testemunhas, sendo o Moddus mais eficiente do que o Ethrel, ou seja, com incrementos de 27,5% e 25,3% respectivamente (Figura 11).

Fatores como variedades e fitorreguladores e as interações entre variedades e fitorreguladores; variedades e solo; fitorreguladores e solo; e variedades, solo e fitorreguladores influenciaram significativamente as médias de massa seca de raízes das plantas, como mostra a Tabela 18.



**Figura 11.** Altura (cm) das variedades RB72454, RB835486 e RB855156 de cana-de-açúcar cultivadas em solo sem tratamento (A) e tratado (B), com aplicação dos fitorreguladores Moddus e Ethrel, via solo.

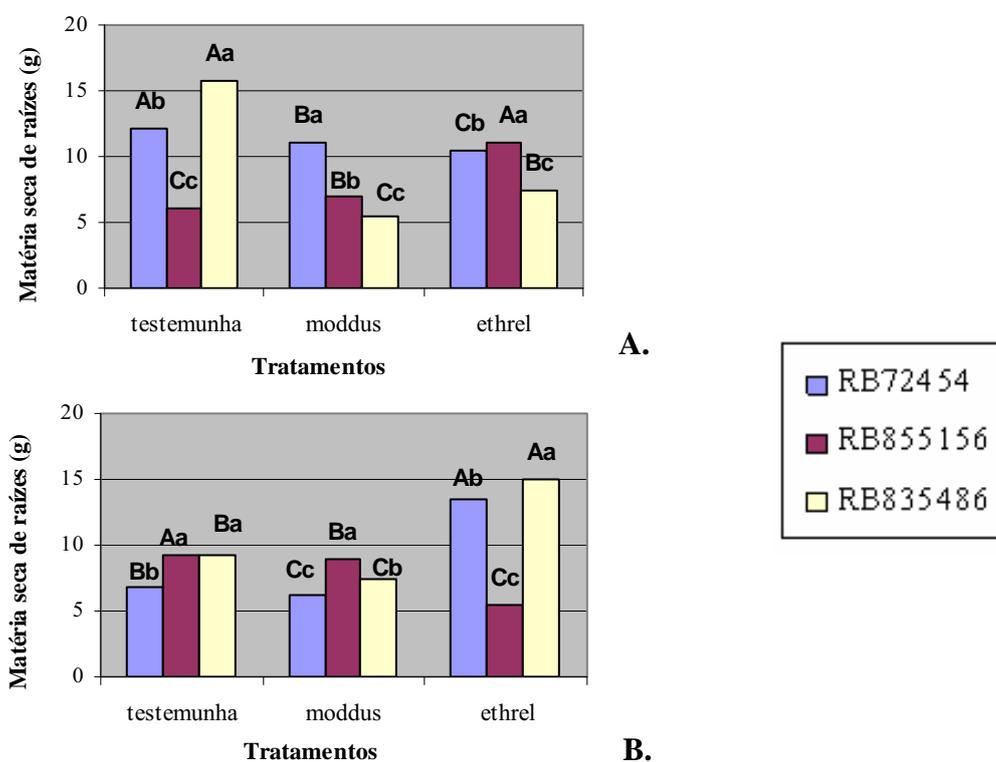
**Tabela 18.** Análise de variância para matéria seca de raízes (g) de plantas de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo tratado e sem tratamento, com e sem aplicação de fitorreguladores via solo.

Fontes de variação	GL	QM	F
Variedades	2	31,0649	7,7372**
Fitorreguladores	2	44,0505	10,9715**
Solo	1	5,2265	1,3018 <sup>ns</sup>
Varied. X Fitor.	4	18,3472	4,5697**
Varied X Solo	2	13,2105	3,2903*
Fitor. X Solo	2	23,2372	5,7876**
Varied. X Fitor. X Solo	4	58,3577	14,5349**
Resíduo	36		
Coeficiente de variação (%) = 9,71			

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%; n.s. não significativo

Em solo sem tratamento (Figura 12), observou-se que a matéria seca de raízes também apresentou diferenças, sendo maior para a variedade RB835486, seguida pela RB72454 e RB855156, esta última a menor. Para o tratamento fitorreguladores, houve aumento na matéria seca de raízes da variedade RB855156, tanto para Ethrel quanto para Moddus, havendo um incremento da ordem de 80,32% e 14,75% respectivamente. Para as duas outras variedades, o tratamento com fitorreguladores inibiu o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 12).

Em solo tratado, as variedades RB72454 e RB835486 responderam positivamente à aplicação de Ethrel, com aumento na matéria seca de raízes. Ao contrário, aplicação de Moddus para as mesmas variedades inibiu o desenvolvimento do sistema radicular, o qual apresentou valor inferior ao do tratamento testemunha. Para a variedade RB855156, a matéria seca de raízes do tratamento testemunha foi superior aos tratamentos com os fitorreguladores (Figura 12).



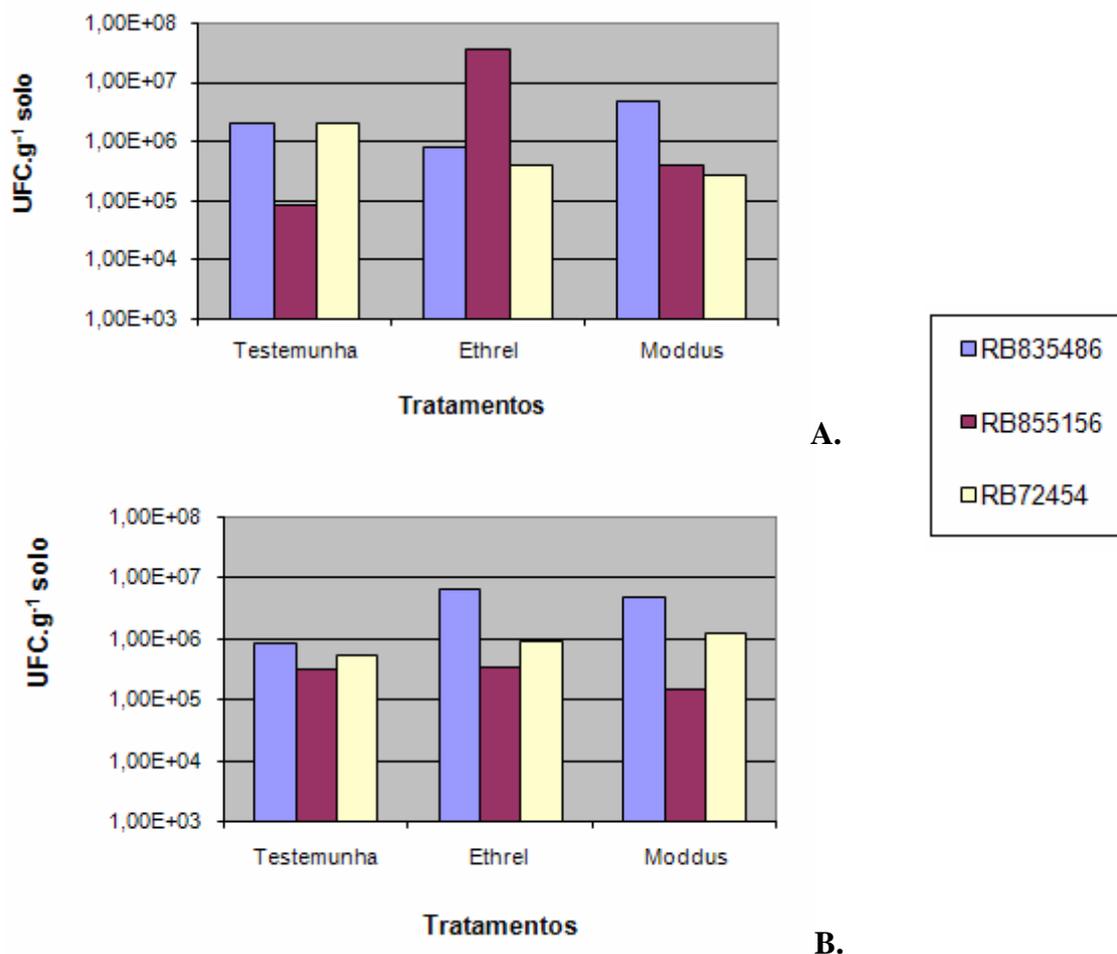
**Figura 12.** Matéria seca de raízes (g) para as variedades RB72454, RB855156 e RB835486 de cana-de-açúcar, cultivadas em solo sem tratamento (A) e tratado (B) com aplicação dos fitorreguladores Moddus e Ethrel, via solo.

Os efeitos da aplicação de fitorreguladores no solo antes do plantio das três variedades de cana-de-açúcar variaram principalmente em decorrência do tratamento do solo. Em solo sem tratamento com brometo de metila, ambos os produtos utilizados estimularam o desenvolvimento da parte aérea das variedades RB855156 e RB835486, mas apenas para a primeira foi observado um aumento na matéria seca de raízes. Em solo tratado, as variedades RB72454 e RB835486 foram favorecidas com a utilização de ambos os produtos no desenvolvimento da parte aérea, enquanto que apenas o Ethrel estimulou o desenvolvimento da matéria seca do sistema radicular. Portanto, observou-se que a aplicação dos fitorreguladores pode ter efeito sobre toda a planta ou parte dela, dependendo da variedade e do produto utilizado.

#### **4.3. Isolamento de rizobactérias de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores**

O efeito dos fitorreguladores Moddus e Ethrel foi avaliado ao final do experimento em casa-de-vegetação, através da determinação do número de colônias que cresceram em meio de cultura B de King. Na Figura 13, estão apresentados os resultados das contagens do número de colônias isoladas das amostras do solo, dos tratamentos onde os produtos foram aplicados no solo antes do plantio. Foram observadas diferenças no número de UFC em decorrência da variedade de cana, do tratamento do solo e do tipo de fitorregulador utilizado.

Na variedade RB835486, a aplicação de Moddus aumentou o número de rizobactérias, quando aplicado no solo no momento do plantio. Quando em solo tratado, ambos os produtos proporcionaram aumento semelhante ao número de UFC.g<sup>-1</sup> do solo seco. Para a variedade RB855156, as aplicações dos fitorreguladores proporcionaram aumento de UFC.g<sup>-1</sup> do solo sem tratamento (Figura 13).

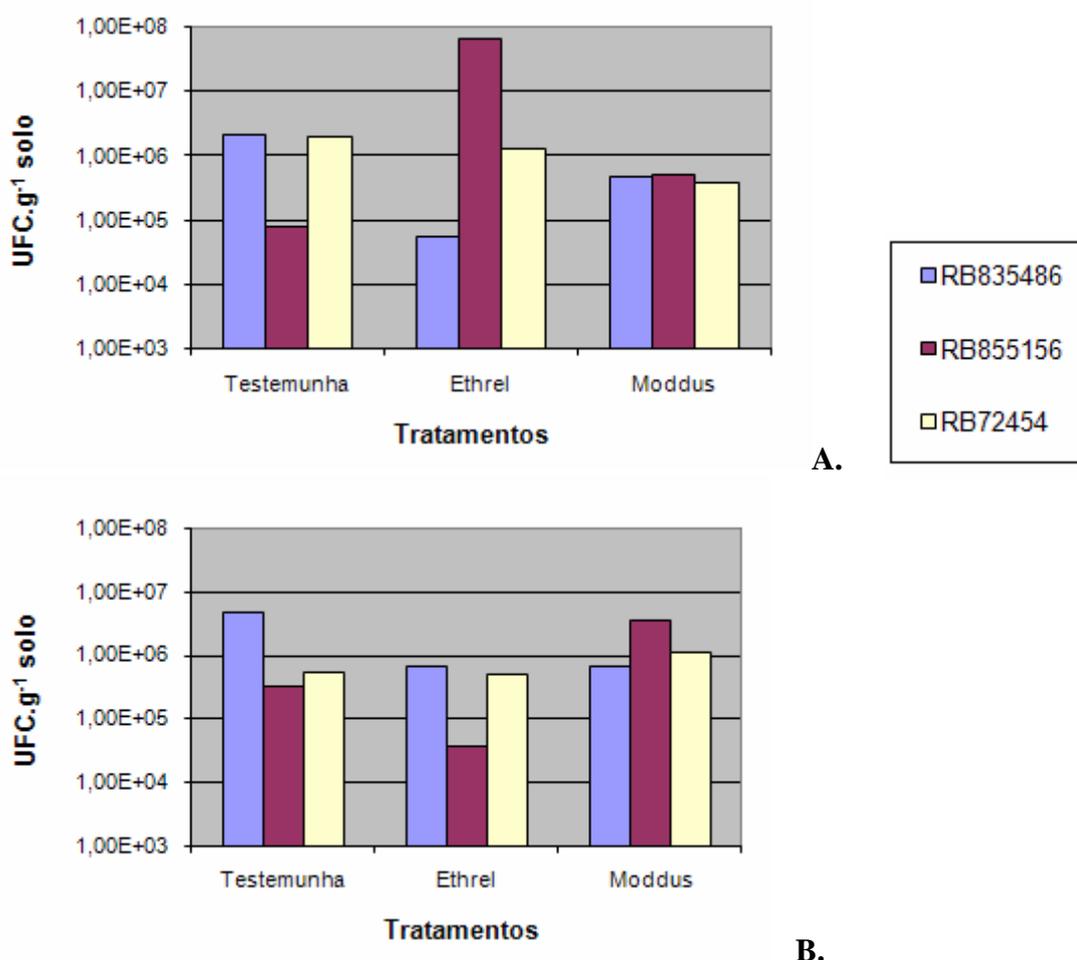


**Figura 13.** Número de rizobactérias (UFC.g<sup>-1</sup> solo) isoladas de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores aplicados via solo. (A) Solo sem tratamento; (B) Solo tratado.

Já em solo tratado, para ambos os produtos utilizados, o número de rizobactérias foi inferior ou similar àquele verificado no controle (Figura 13). Para RB72454, à semelhança do que ocorreu com a RB835456, somente quando os fitorreguladores foram aplicados em solo tratado houve incremento do número de rizobactérias. Em solo sem tratamento, os números de bactérias em solo aplicado com fitorreguladores foram inferiores àquele determinado no controle. Comparando-se os resultados obtidos nestes experimentos com os parâmetros biométricos determinados anteriormente, quanto à altura das plantas e massa seca do sistema radicular, os resultados aqui obtidos demonstraram que a variedade RB855156 foi a mais favorecida

com a aplicação dos fitorreguladores, onde também foram isolados os maiores números de UFC de rizobactérias. Os mesmos resultados foram observados para as variedades BR835486 e RB72454 quando em solo tratado (Figura 13). Para a variedade RB855156, os maiores valores para altura e massa seca do sistema radicular foram também obtidos no tratamento com Moddus, coincidindo com os maiores números de rizobactérias isoladas no tratamento, especialmente *Pseudomonas*.

Os resultados obtidos quanto aos isolamentos de rizobactérias dos tratamentos desenvolvidos em casa-de-vegetação, com aplicação dos fitorreguladores via foliar encontram-se na Figura 14.



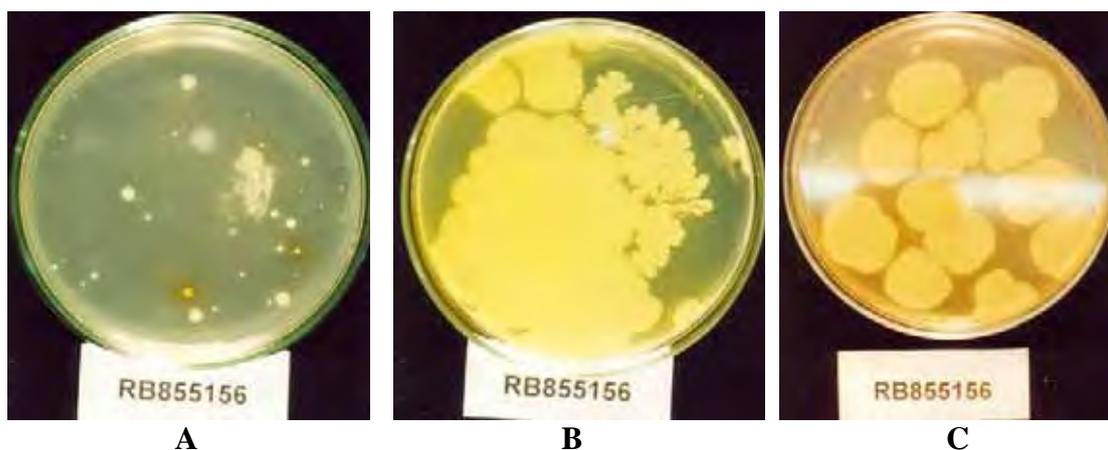
**Figura 14.** Número de rizobactérias (UFC.g<sup>-1</sup> solo) isoladas de três variedades de cana-de-açúcar tratadas com fitorreguladores aplicados via foliar. (A) Solo sem tratamento; (B) Solo tratado.

Verificou-se que para a variedade RB835486, os fitorreguladores contribuíram para o decréscimo do UFC.g<sup>-1</sup> das rizobactérias, tanto para solo tratado ou não com brometo de metila. Para a variedade RB72454, o número de colônias de rizobactérias diminuiu em solo sem tratamento com a aplicação de fitorreguladores. Para solo tratado, apenas a aplicação de Moddus proporcionou incrementos no número de rizobactérias (Figura 14). Resultados diferentes foram observados quanto à variedade RB855156, onde o número desses microrganismos aumentou no solo sem tratamento e com o uso dos dois fitorreguladores. Em solo tratado, somente o uso de Moddus acarretou este mesmo efeito.

Na Figura 15, pode ser verificado que, apesar das diferenças dos efeitos das aplicações e dos tratamentos de solo quanto ao número de rizobactérias, observa-se que os fitorreguladores contribuíram para modificar a diversidade destes microrganismos na variedade RB855156. Os isolados dos solos tratados e aplicados com fitorreguladores apresentaram colônias com crescimento rápido, de coloração que variou de creme a marrom, com aspecto mucoso, e que liberaram no meio de cultura compostos que tornaram o meio de coloração amarelo-esverdeada, sendo que alguns isolados apresentaram fluorescência. Estas são algumas das características morfológicas de bactérias *Pseudomonas*. Dos experimentos com solo tratado e aplicados fitorreguladores, foi possível selecionar oito isolados do tratamento com Ethrel e dezenove do tratamento com Moddus. Do solo sem tratamento, também foram selecionados seis isolados da testemunha e quatro de Ethrel aplicado via foliar para a mesma variedade. Não foi obtido nenhum isolado da variedade RB72454 e apenas três da variedade RB835486.

Embora as bactérias *Pseudomonas* demonstrassem ser altamente sensíveis aos distintos tratamentos utilizados para cana-de-açúcar, elas apresentaram uma rápida recolonização nos solos tratados, devido provavelmente aos possíveis antagonistas terem sido destruídos, a sua maior taxa de multiplicação, sua capacidade de colonização das raízes, de produzir várias substâncias inibidoras em relação a outros microrganismos, tanto os patogênicos quanto os deletérios, e por serem capazes de utilizar como fonte de carbono e energia a maioria dos compostos liberados pelas plantas na forma de exsudatos radiculares. Riedge (1976), Gamliel e Katan (1991),

Gamiel e Stapleton (1993) e Freitas (2001) mostraram que o tratamento do solo com brometo de metila ou com solarização reduziu significativamente a população de *Pseudomonas fluorescens*, mas que após o plantio, a bactéria rapidamente coloniza a rizosfera e as raízes das plantas, mencionando que em alguns casos o aumento observado foi de 10 até 130 vezes maior.



**Figura 15.** Colônias de rizobactérias isoladas da variedade RB855156, em meio B de King. Legenda: (A) solo tratado sem aplicação de fitoreguladores, (B) solo tratado com aplicação de Ethrel via foliar e (C) solo tratado com aplicação de Moddus via foliar.

#### 4.4. Antagonismo *in vitro* entre fungos fitopatogênicos e rizobactérias

Baseando-se na acentuada produção de pigmentos fluorescentes em meio B de King, do total de bactérias obtidas das rizosferas de diferentes variedades de cana-de-açúcar e tratamentos, foram selecionados 37 isolados para verificar possível antagonismo *in vitro* contra fungos fitopatogênicos, cujos resultados encontram-se na Tabela 19. De acordo com o crescimento em placa, o antagonismo foi enquadrado em uma escala classificatória de 1 a 5 (MARTINS et al. 2003, modificado), com objetivo de facilitar a interpretação dos resultados, uma vez que foram avaliados 37 isolados de rizobactérias em relação à três patógenos e em dois meios de cultura, BDA e B de King.

**Tabela 19.** Antagonismo *in vitro* entre rizobactérias e fungos fitopatogênicos nos meios de cultura BDA e B de King, conforme escala classificatória de Martins et al.(2004),modificado<sup>1</sup>.

ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>						
Rizobactérias	<i>Fusarium</i> spp.		<i>Thielaviopsis paradoxa</i>		<i>Hendersonina sacchari</i>	
	B de King	BDA	B de King	BDA	B de King	BDA
Ps1	5	3	4	4	2	2
Ps2	3	2	3	4	2	2
Ps86	3	3	5	3	3	3
Ps98	3	3	2	4	1	4
Ps109	3	3	2	3	3	3
Ps1411	5	4	3	4	5	3
Ps1412	3	4	3	4	2	4
Ps1413	5	2	4	4	3	4
Ps1571	3	3	2	4	4	4
Ps1572	5	2	2	4	2	3
Ps1573	3	2	2	3	5	3
Ps1574	3	2	3	3	5	3
Ps1575	5	4	1	4	3	4
Ps1631	3	3	3	4	1	3
Ps1632	3	3	5	4	1	4
Ps1633	2	2	2	4	1	4
Ps1634	5	4	1	4	2	4
Ps1635	5	4	1	4	3	4
Ps1636	5	4	1	4	3	4
Ps1637	5	3	1	4	3	4
Ps165	5	4	4	4	2	3
Ps1691	2	4	1	4	1	4
Ps1692	3	3	2	4	3	4
Ps1693	3	3	3	4	2	4
Ps1694	3	3	5	4	2	3
Ps1695	5	3	5	4	3	3
Ps1696	5	3	3	4	2	3
Ps1697	3	3	3	4	3	3
Ps1698	3	3	3	4	3	3
Ps1699	3	2	3	4	2	3
Ps16910	3	2	2	4	2	2
Ps16911	3	2	3	4	2	3
Ps16912	3	2	3	4	1	2
Ps16913	3	2	1	4	3	2
Ps16914	5	4	1	4	2	3
Ps16915	3	3	3	3	1	3
Ps16916	3	3	4	4	2	3

<sup>1</sup> 1.Forte antagonismo entre o fungo e a bactéria, com pequeno desenvolvimento do fungo

2.Forte antagonismo entre o fungo e a bactéria, com grande halo de inibição em torno da colônia bacteriana

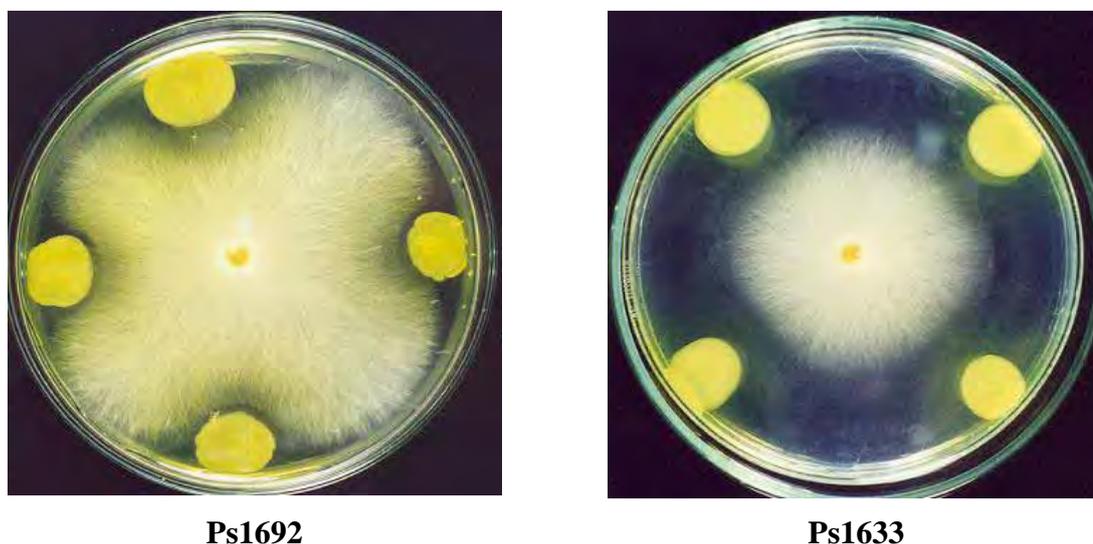
3.Fraco antagonismo, com pequeno halo de inibição ou com o fungo apenas evitando crescer sobre a colônia bacteriana

4.Nenhum antagonismo, com crescimento fúngico sobre a colônia bacteriana

5.Antagonismo, com crescimento da bactéria sobre a colônia do fungo, o qual não se desenvolve

Dos 37 isolados de rizobactérias, 100% mostraram-se capazes de controlar *Fusarium spp. in vitro*, em meio B de King, e ainda 75,6% deles também foram capazes de inibi-lo em meio BDA. Os dados mostraram que o fungo pode ser inibido tanto pela produção de sideróforo (competição por ferro) quanto pela produção de antibióticos, cujos resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Amorim e Melo (2002). No meio B de King, a maioria dos isolados apresentou fraco antagonismo (classe 3), verificando-se a formação de pequeno halo de inibição, de 1 a 2 mm, conforme pode ser observado na Tabela 19 e Figura 16. Os isolados Ps1633 e Ps1691 apresentaram no mesmo meio de cultura um forte antagonismo (classe 2), conforme observado na Tabela 19 e na Figura 16. Cerca de 32,43% dos isolados apresentaram antagonismo do tipo classe 5 (Tabela 19).

No meio BDA, dos 75,6 % dos isolados que se mostraram antagônicos ao *Fusarium spp.*, 45,9% apresentaram fraco antagonismo (classe 3) e os outros 29,7% apresentaram forte antagonismo (classe 2), como mostram os dados apresentados na Tabela 19 e Figura 17.



**Figura 16.** Antagonismo *in vitro* entre isolados de rizobactérias e o fungo *Fusarium spp.*, em meio de cultura B de King.



**Figura 17.** Antagonismo *in vitro* entre o isolado Ps1632 e o fungo *Fusarium* spp, em meio de cultura BDA.

Melo e Valarini (1995) selecionaram rizobactérias para o controle biológico de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., agente causal da podridão radicular de pepino, e de 18 bactérias testadas, apenas três (16,6%) foram eficientes no controle do crescimento micelial do patógeno *in vitro*. Martins et al. (2003), em trabalho semelhante para controle da murcha fusariana em feijão, causada por *Fusarium oxysporum phaseoli*, de 40 isolados testados, nos meios de cultura B de King e BDA, todos se mostraram antagonísticos ao patógeno, porém diferenciaram-se quanto à indução de halo de inibição. Dois (5%) e um (2,5%) deles mostraram-se altamente eficazes, pois induziram a formação de grandes halos de inibição (maiores que 10 mm), nos meios B de King e BDA, respectivamente. Os demais isolados mostraram médio (halos entre 5 e 10 mm) ou baixo antagonismo (halos inferiores a 5mm). Os autores, assim como Weller (1988) e Thomashow et al.(1990), atribuíram a diferença no grau de antagonismo entre os meios de cultura à baixa produção de pigmentos fluorescentes no BDA, pigmentos estes que teriam em sua composição substâncias inibidoras do crescimento de fungos.

Para o fungo *Thielaviopsis paradoxa*, 89,1% e 13,5% dos isolados de rizobactérias inibiram o patógeno em meio de cultura B de King e BDA, respectivamente (Tabela 19 e Figura 18). Cerca de 10,8% não apresentaram antagonismo em nenhum dos meios utilizados tais como Ps1, Ps1413, Ps165 e Ps16916 (Tabela 19), ou seja a totalidade da superfície da placa foi tomada pelo patógeno,

anulando o antagonista. Todos os isolados que inibiram o patógeno em meio BDA também o fizeram em B de King, como os isolados Ps86, Ps109, Ps1533, Ps1534 e Ps16915, demonstrando como descrito a seguir, que utilizam pelo menos dois mecanismos de ação contra *T. paradoxa*, o que os torna excelentes candidatos a agentes de controle biológico (STADNIK e BETTIOL, 2000). Na Figura 18, é possível observar que em meio BDA, ocorrem duas situações distintas, sendo que em uma delas há formação de pequeno halo de inibição entre a colônia do fungo e da bactéria, indicando que a interação foi resultado de produção de antibióticos.

Com alguns isolados (Ps1631, Ps109 e Ps86) não se observou formação de halo de inibição, mas verificou-se o fungo evitando crescer sobre a colônia bacteriana, indicando, como forma de interação, competição por nutrientes entre as colônias de microrganismos (Figura 18). Esta é uma das formas de antagonismo também descrita em outros trabalhos como uma das formas de controle biológico de fitopatógenos empregando-se rizobactérias (DE BOER et al., 1999, SOTTERO et al., 2006).



**Figura 18.** Antagonismo *in vitro* entre rizobactérias e os isolados Ps1631, Ps109 e Ps86 e o fungo *Thielaviopsis paradoxa*.

No meio B de King, pobre em ferro, oito dos isolados (21,6%) inibiram completamente o crescimento do patógeno (classe 1), como mostra a Figura 19 e Tabela 19, onde se observa o antagonista ocupando quase que a totalidade da superfície da placa. Isolados com esta característica são considerados de elevado potencial antagônico (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000).



**Figura 19.** Antagonismo *in vitro* entre o isolado Ps1635 o fungo *Thielaviopsis paradoxa*, em meio B de King.

A inibição do crescimento em meio B de King permitiu identificar outro possível mecanismo utilizado pelas rizobactérias para exercerem seu antagonismo contra *T. paradoxa*, ou seja, pela produção de sideróforo. Para comprovar tais resultados, o patógeno foi colocado para crescer juntamente com as rizobactérias em meio B de King líquido, suplementado com diferentes concentrações de  $\text{FeCl}_3$  (MARIANO et al., 2000). Analisando-se a Figura 20, verifica-se que no meio sem adição de ferro, não houve crescimento do patógeno, ao contrário dos outros tratamentos, onde se evidencia o seu crescimento pela coloração escura do meio de cultura. Isto significa que o fungo precisa de ferro para crescimento, e se a rizobactéria é produtora de sideróforo, o qual complexa o nutriente tornando-o indisponível para o fungo, este mecanismo pode ser o utilizado para o biocontrole do fungo. Os resultados

estão de acordo com os obtidos por Kloepper et al. (1980) onde a atividade do sideróforo foi determinada pela perda da inibição do patógeno pela adição de  $\text{FeCl}_3$  ao meio de cultura.



**Figura 20.** Crescimento da rizobactéria, isolado Ps1635, e *Thielaviopsis paradoxa* em meio B de King suplementado com 0, 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ .

Para os isolados que inibiram totalmente o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa*, além da produção de sideróforos, foi também observada a produção de outro metabólito secundário, o ácido cianídrico (Figura 21).

**Ps109****Ps1635****Ps 1634**

**Figura 21.** Isolados de rizobactérias não produtoras de ácido cianídrico (papel de cor amarela) e produtoras de ácido cianídrico (papel de cor laranja).

Para o fungo *Hendersonina sacchari*, 97,2% e 64,9% dos isolados inibiram o crescimento do patógeno em meio B de King e BDA, respectivamente. Vinte e quatro deles (64,8%) foram antagônicos em ambos os meios de cultura e apenas um deles (2,7%) não apresentou antagonismo em nenhum dos meios (Ps1571) aqui utilizados.

Vinte isolados foram antagônicos a *Fusarium ssp.* e *Hendersonina sacchari* nos dois meios de cultura. Seis isolados (Ps1422, Ps1575, Ps1634, Ps1635, Ps1636 e Ps1691) foram antagônicos aos três patógenos apenas em meio B de King. Cinco isolados (Ps 86, Ps109, Ps1573, Ps 1574 e Ps16915) foram antagônicos aos três patógenos e nos dois meios de cultura, características que os tornam mais promissores para estudos subsequentes de seleção *in vivo*.

#### **4.5. Teste de promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação**

Seis isolados de rizobactérias descritos no item anterior (Ps86, Ps109, Ps1632, Ps1634, Ps1635 e Ps1691) mostraram-se capazes de acelerar a brotação das gemas, quando comparados com a testemunha (Tabela 20). Decorridos 20 dias da data de plantio dos toletes, 89% das gemas inoculadas com o isolado Ps1635 já haviam brotado, assim como 75% das gemas inoculadas com Ps1632, Ps1634 e Ps1691; 50%

daquelas inoculadas com Ps86 e 39% daquelas inoculadas com Ps109; e apenas 12,5% para a testemunha (sem inoculação com as rizobactérias). Analisando-se estes resultados, considerou-se que essas rizobactérias têm potencial de acelerar a brotação. Kloepper et al. (1996) citado por Pan et al. (2002), Luz (2001) e Chandra et al. (2007) mostraram que para canola, soja, trigo e mostarda, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas aumentavam a emergência de sementes e as denominaram de rizobactérias promotoras de emergência. No caso específico de cana-de-açúcar, elas provavelmente poderiam ser utilizadas em variedades de difícil brotação e ainda naquelas suscetíveis à podridão abacaxi, onde o fungo começa a exercer influência nas gemas que não brotam, após dezesseis dias da data de plantio (BOYD e GALLI, 1966).

**Tabela 20.** Influência de rizobactérias no desenvolvimento de plântulas da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação.

Rizobactérias	Brotação (%)	Altura <sup>1</sup> (cm)	IAA (%)	MAS <sup>1</sup> (g)	IAMSA (%)	MSR <sup>1</sup> (g)	IAMSR (%)
Testemunha	25	14,0 c	0	10,3 c	0	9,33 a	0
Ps86	50	16,8 bc	17,8	13,9 ab	34,9	10,30 a	10,3
Ps109	39	17,8 b	25,0	11,0 c	6,7	9,84 a	5,8
Ps1632	75	21,4 a	52,8	14,1 ab	36,8	11,69 a	25,2
Ps1634	75	17,1 bc	22,1	12,5 bc	21,3	9,78 a	4,8
Ps1635	89	19,5 ab	39,2	14,7 ab	42,7	10,25 a	9,8
Ps1691	75	22,2 a	58,7	15,5 a	50,4	10,91 a	16,9

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância.

*Legenda:* IAA=índice de aumento da altura; MAS=matéria seca da parte aérea; IAMSA= índice de aumento da matéria seca da parte aérea; MSR=matéria seca de raízes; IAMSR= índice de aumento da matéria seca de raízes. Os índices foram calculados conforme item 3.6.

As plântulas obtidas de toletes inoculados com rizobactérias apresentaram diferentes respostas em relação às variáveis analisadas, mostrando que os isolados tiveram influência positiva ou neutra sobre a brotação das gemas, crescimento e desenvolvimento do sistema radicular (Tabela 20). Não foi verificado efeito deletério da inoculação das bactérias no crescimento das plantas, fato bastante comum quando se estudam estes microrganismos com este mesmo objetivo (SILVEIRA et al., 2004, SOTTERO et al., 2006). O tratamento dos toletes com o isolado Ps1634 não apresentou aumento significativo para os parâmetros avaliados, embora os valores determinados, quando comparados com a testemunha, tenham sido superiores. Para o tratamento com o isolado Ps86, embora este não tenha diferido estatisticamente da testemunha para altura e matéria seca de raízes, exerceu efeito positivo e estatisticamente significativo sobre a biomassa da parte aérea, traduzida pelo aumento da matéria seca da parte aérea (Tabela 20).

Plântulas obtidas de tratamento com os isolados Ps109, Ps1632, Ps1635 e Ps1691, em relação às testemunhas, tiveram aumento na altura estatisticamente significativo, com índices de aumentos que variaram de 25,0 a 58,7%. Para os mesmos isolados, esses efeitos positivos da produção de biomassa foram traduzidos pelos aumentos da matéria seca da parte aérea, com índices de aumentos de 34,9 a 50,4%. Com relação à matéria seca da parte aérea, com exceção dos isolados Ps109 e Ps1634, todos diferiram estatisticamente da testemunha. A diferença observada chegou a 50,4% em plantas inoculadas com o isolado Ps1691; 42,7% com o Ps1635; 36,8% para àquelas com Ps1632 e 34,9% com o isolado Ps86 (Tabela 20).

Os isolados Ps1691, Ps1635 e Ps1632 foram benéficos, considerando-se tanto a altura das plantas como a matéria seca da parte aérea. Os resultados com matéria seca das raízes apresentaram valores que superaram aqueles no tratamento testemunha, no entanto, estas não foram significativas estatisticamente (Tabela 20). Estes resultados são contrários aos obtidos por Silveira et al. (1995), os quais observaram aumento da matéria seca de raízes de plantas de feijão que foram inoculadas com *Pseudomonas* spp., mas não houve diferenças quanto à matéria seca da parte aérea. Alguns trabalhos têm comentado que os benefícios da inoculação com rizobactérias podem ser observados na planta toda ou em parte dela. Freitas e Vildoso (2004) relataram que em plantas de limoeiro cravo colhidas 260 dias após a inoculação com diferentes isolados

de rizobactérias, os benefícios somente foram observados para matéria seca de raízes. Chandra et al. (2004) relataram que para mostarda, os benefícios observados foram sobre todos os parâmetros avaliados, como altura, peso fresco da parte aérea e de raízes e o comprimento das raízes. Melo e Valarini (1995) e Silveira et al. (2004) observaram aumentos significativos para a matéria seca da parte aérea e raízes de pepino.

Para o isolado Ps1635, foi detectada também a produção de ácido indol acético (Figura 22), o que poderia explicar em parte a promoção do crescimento vegetal. No entanto, para o isolado Ps1634, embora este tenha mostrado ser solubilizador de fosfato inorgânico, não foram observadas diferenças significativas para a promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar (Tabela 20, Figura 22).

Apesar do número significativo de pesquisas sobre a utilização de rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas para diversas espécies de importância agrícola, nenhum trabalho foi realizado com cana-de-açúcar.



**Figura 22.** A) Membrana de nitrocelulose corada com reagente de Salkowski evidenciando produção de ácido indol acético pelo isolado Ps1635 B) Halo de solubilização de fosfato inorgânico produzido pelo isolado Ps1634 em meio BDYA suplementado.

#### 4.6. Antagonismo *in vivo* de isolados de rizobactérias contra *Thielaviopsis paradoxa*

Este teste foi realizado com a variedade RB72454 desenvolvida pelo Programa de Melhoramento da Cana-de-Açúcar (PMGCA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos. Esta variedade foi lançada comercialmente em 1988, tendo excelentes características agrônômicas, como brotação regular, bom perfilhamento e fechamento entre linhas e baixa exigência em solo. É uma variedade de maturação média-tardia, representando uma das melhores opções para final de safra. Quanto às doenças, é suscetível à podridão abacaxi e estrias vermelhas, e intermediária à podridão de *Fusarium*. Devido à sua grande produtividade, foi durante muitos anos a variedade mais plantada na região Centro-Sul. Atualmente, sua área cultivada ainda é bastante representativa.

Dentre os isolados que conseguiram inibir o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa in vitro*, foram escolhidos Ps1575, Ps1631, Ps1632, Ps1635 e Ps109, os quais apresentaram diferentes graus de antagonismo nos testes *in vitro*. O isolado Ps109 mostrou antagonismo nos dois meios de cultura; Ps1635 e Ps1575 apresentaram forte antagonismo em meio B de King, inibindo totalmente o crescimento do fungo; Ps1632 apresentou antagonismo, com a bactéria crescendo sobre a colônia do fungo, o qual não se desenvolveu; e Ps1631, o qual apresentou fraco antagonismo, com o fungo evitando crescer sobre a colônia bacteriana (Tabela 19).

Embora em teste *in vitro* os isolados bacterianos tenham respondido diferentemente quando confrontados com o patógeno, nos tratamentos dos toletes, os isolados bacterianos não diferiram entre si quanto à capacidade de controlar a doença (Tabela 21), mostrando que os vários mecanismos de ação foram capazes de reduzir a doença. Os isolados apresentaram elevado índice de proteção, constatando-se ao final do ensaio, de 40,5 a 60,0% de redução da doença.

Os dados aqui apresentados permitiram correlacionar o antagonismo *in vitro* e *in vivo*. Dados semelhantes foram encontrados por Lucon e Melo (1999), os quais observaram que rizobactérias apresentaram ação antagônica à *Erwinia carotovora in vitro* e *in vivo*. Diferentemente, outros trabalhos têm reportado a ausência de correlação (FREITAS e PIZZINATTO, 1991, 1993; SOTTERO et al., 2006).

**Tabela 21.** Eficiência de isolados de rizobactérias no controle da doença podridão abacaxi, causada por *Thielaviopsis paradoxa*, em toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454.

Tratamentos	Controle da doença (%) <sup>1</sup>
Testemunha	0,0 b
Ps1575	60,6 a
Ps1631	50,8 a
Ps1632	46,2 a
Ps1635	45,4 a
Ps109	40,5 a

Coeficiente de variação (%) = 34

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 1% de significância.

Muitos trabalhos têm relatado o potencial de espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* no controle biológico de patógenos, especialmente espécies de *Fusarium* (MELO e VALARINI, 1995; DE BOER et al., 1999; MARTINS et al., 2003) e *Thielaviopsis basicola*.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de fitorreguladores é uma prática bastante utilizada no atual modelo de produção agrícola, com a finalidade de incrementar a produção, melhorar a qualidade da matéria prima e facilitar a colheita. Os fitorreguladores vegetais fazem parte de um grupo de substâncias denominadas hormônios vegetais, onde temos os grupos das auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e inibidores de crescimento. A escolha do produto e a forma de aplicação estão associadas aos objetivos a serem alcançados.

Este trabalho demonstrou que a aplicação dos fitorreguladores Ethrel e Moddus via solo provocou efeitos positivos no desenvolvimento em altura das plantas de três variedades de cana-de-açúcar (RB72454, RB835486 e RB855156), independente do solo ter sido previamente tratado com brometo de metila. No entanto, no desenvolvimento do sistema radicular expresso em matéria seca de raízes, somente foram verificados efeitos positivos para solo tratado e aplicado com Ethrel. Uma possível explicação seria que o Ethrel quando aplicado no solo sem tratamento, libera etileno, aumentando a concentração deste na atmosfera do solo, uma vez que os microrganismos do solo também o produzem. Altas concentrações deste gás inibem o desenvolvimento do sistema radicular, como já citado anteriormente.

Quanto ao Moddus, o fato de que ele seja rapidamente degradado no solo, pode explicar a ausência de resposta das variedades em desenvolvimento do sistema radicular, com a aplicação do produto.

Para a variedade RB855156, foram verificados resultados diferentes, sendo que nenhum dos fitorreguladores promoveu incrementos no sistema radicular em solo tratado, porém ambos os fitorreguladores tiveram influência para o mesmo parâmetro

em solo sem tratamento. Partindo do exposto acima, e que a concentração de produto utilizado foi a mesma para as três variedades, podemos supor que para esta variedade a presença da microbiota produzindo etileno, juntamente com a quantidade aplicada, tornaram o volume de gás suficiente para promover o desenvolvimento do sistema radicular. Estas diferenças podem estar ligadas ao fator variedade, de forma direta e/ou indireta. As três variedades apresentam características morfológicas e fisiológicas diferentes, de forma a influir na resposta aos fitorreguladores; ou indiretamente, pelo resultado da exsudação de substâncias pelas raízes das plantas, que “caracterizam” a microbiota rizosférica da variedade.

Uma questão pode ser levantada para a variedade RB855156: por que em solo tratado a aplicação do Ethrel não proporcionou incrementos na matéria seca das raízes, como aconteceu com as outras variedades? Provavelmente, como já mencionado anteriormente, a concentração de etileno liberado no solo pelo Ethrel foi insuficiente para estimular o desenvolvimento do sistema radicular, o que corrobora a afirmação anterior do papel determinante da microbiota rizosférica na resposta da variedade à aplicação dos fitorreguladores.

E como explicar então que a aplicação dos fitorreguladores em solo sem tratamento não proporcionou aumento no sistema radicular, mas influenciou na altura das plantas? Os resultados dos plaqueamentos de amostras de solo sem tratamento mostraram que os fitorreguladores diminuíram significativamente a comunidade de fungos. A possível redução dos grupos patogênicos e/ou deletérios permitiu o desenvolvimento de um sistema radicular mais sadio e eficiente (não necessariamente maior, como verificado nos resultados), o que resultou em benefício para o desenvolvimento da parte aérea da planta.

Outro fator que pode ter colaborado é a seleção de grupos bacterianos pela ação dos fitorreguladores, possivelmente *Pseudomonas*, que colonizam rapidamente as raízes, exercendo efeitos benéficos para as plantas. Os resultados aqui obtidos mostraram que apesar da redução no número de unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas* com aplicação dos fitorreguladores, verificou-se um predomínio de colônias com produção de pigmentos amarelo-esverdeados, característicos deste grupo bacteriano.

Diferentemente do observado na aplicação dos fitorreguladores via solo, quando aplicados via foliar, os efeitos deles sobre o sistema radicular, dependeram principalmente da variedade de cana-de-açúcar. Já para a altura das plantas, o tratamento do solo foi o que ocasionou efeitos mais significativos. Como esperado, as plantas originadas de gemas tratadas com Ethrel e Moddus apresentaram redução na altura, sendo o Moddus mais eficiente que o Ethrel.

Esta interação entre variedade e fitorreguladores em relação ao sistema radicular, talvez possa ser explicada como sendo modificações na microbiota da rizosfera, induzidas pela aplicação foliar de Ethrel ou Moddus, podendo ser resultado de exsudação destas substâncias ou de seus metabólitos pelas raízes das plantas, por seus efeitos no metabolismo das plantas ou pela participação de ambos os processos.

A variedade RB855156 foi a que respondeu melhor aos efeitos dos fitorreguladores e do tratamento do solo, apresentando maior altura e maior desenvolvimento do sistema radicular.

Também desta variedade foi isolado o maior número de rizobactérias com características de emissão de fluorescência, de solo tratado e aplicado com fitorreguladores. O tratamento do solo com brometo de metila eliminou os microrganismos patogênicos e/ou deletérios assim como os sapróbios, favorecendo a recolonização das raízes por bactérias provavelmente do gênero *Pseudomonas*. Os isolados selecionados mostraram-se antagônicos aos fungos fitopatogênicos (*Thielaviopsis paradoxa*, *Hendersonina sacchari* e *Fusarium* spp) e alguns deles promoveram o crescimento de plântulas em casa-de-vegetação.

Em campo, já haviam sido constatadas inconsistências nos resultados da aplicação de fitorreguladores na cultura da cana-de-açúcar, variando as respostas em função da variedade, tipo de fitorregulador, tipo de solo, enfim, não se observando um padrão de resposta única. Os experimentos laboratoriais e em casa-de-vegetação mostraram o mesmo perfil de resposta, indicando que para cada variedade há de se avaliar o tipo de fitorregulador e a concentração que possam ser empregados para obtenção de benefícios de produtividade.

Dos resultados obtidos, pode-se inferir que além dos efeitos diretos dos fitorreguladores sobre as plantas de cana-de-açúcar, eles também exercem uma

influência sobre os microrganismos da rizosfera, revertendo em ação benéfica ao desenvolvimento da cultura.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- as variedades de cana-de-açúcar responderam diferentemente à aplicação dos fitorreguladores Ethrel e Moddus;
- as respostas da aplicação de fitorreguladores via foliar estiveram dependentes das variedades de cana-de-açúcar utilizadas, enquanto que a aplicação no solo esteve relacionada com ou sem tratamento com brometo de metila;
- no estudo do efeito residual da aplicação de fitorreguladores, a variedade mais favorecida foi a RB72454, por apresentar maior desenvolvimento em altura e maior massa seca de raízes quando comparado com o tratamento controle (sem aplicação), respondendo bem à aplicação para ambos os fitorreguladores;
- no estudo da aplicação dos fitorreguladores via solo, a variedade mais favorecida foi a RB815156, que teve sua altura e sistema radicular mais desenvolvidos com a aplicação de Ethrel e Moddus;
- o tratamento do solo com brometo de metila associado à aplicação dos fitorreguladores via foliar possibilitou que maiores números de bactérias *Pseudomonas* fossem isoladas;

- alguns dos isolados de rizobactérias foram capazes de promover o crescimento de plântulas (altura e matéria seca da parte aérea) da variedade RB72454 de cana-de-açúcar;
- a maioria dos isolados foi capaz de controlar in vitro os fitopatógenos *Thielaviopsis paradoxa*, *Hendersonina saacchari* e *Fusarium spp.*, e in vivo, reduzir a podridão abacaxi, doença causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa*;
- entre os isolados de rizobactérias destaca-se o Ps1635, que utilizando-se provavelmente dos mecanismos de produção de sideróforo, de ácido cianídrico e de ácido indol acético, foi capaz de promover o crescimento de plântulas de cana-de-açúcar e de biocontrole de doenças.

## 7. LITERATURA CITADA

ABNEY, T. S. Growth regulator effects on soybean seed maturation and seedborne fungi. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.585-589, 1991.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 1977. 467p.

ALBUQUERQUE, R. C.; GUIMARÃES, M.M.B.; BELTRÃO, N.E.M.; JERÔNIMO, J.F. Efeitos do bioestimulador Stimulate<sup>®</sup> em sementes pré-embebidas de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Disponível em: <<http://www.rbb.ba.gov.br/arquivo/205.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2008.

ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Efeito dos reguladores vegetais de Stimulate no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **PUBLICATION UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, v.6, n.1, p.23-35, 2000.

ALMEIDA, J. C. V.; LEITE, C. R. F.; SOUZA, J. R. P. Efeito de maturadores nas características tecnológicas da cana-de-açúcar com e sem estresse hídrico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.4, p.441-448, 2005.

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**, Cruz das Almas, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soil. **Chemosphere**, Oxford, n.52, p.799-804, 2003

BABIKER, H. M.; PEPPER, I. L. Microbial production of ethylene in desert soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.16, p 559-564, 1984.

BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. - mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.19, n.4, p.451-457, 1987.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non acidic soils. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOSPHORUS COMPOUNDS, 3., 1983, Brussels. **Anais...** Brussels, 1983. p.127-144.

BAYER CROPSCIENCE CHILE. **Productos**. Disponível em: <<http://www.bayercropscience.cl/soluciones/fichaproducto.asp?id=129>>. Acesso em: 23 jan. 2008.

BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L.A. The role of exudates and allelochemical in the rhizosphere. **Plant and Soil**, The Hague, n.256, p.67-83, 2003.

BLEECKER, A. B.; DENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plant. **Annual Reviews Cell and Developmental Biology**, n.16, p.1-18, 2000.

BOYD, H. W.; GALLI, F. Efeito do armazenamento da cana-de-açúcar sobre a germinação e sobre a incidência da podridão abacaxi, causada por *Ceratocystis paradoxa* (de Seynes) Moreau. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v.23, p.229-245, 1966.

BOLTON JUNIOR, H.; FREDRICKSON, J. K.; ELLIOTT, L. F. Microbial ecology of the rhizosphere. In: BLAINE, F.; METTING JUNIOR, F.B. (Ed.). **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.27-63.

BORGES, K. P.; CONEGHIAN, C.M.R.; JESUS, M.A.; DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.; TSAI, S.M. Efeito do herbicida glifosato sobre a comunidade microbiana em solo com sistema de plantio direto complementado com vermicomposto. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 799-802, 2005.

BOTELHO, G. R.; GUIMARAES, V.F.; BONIS, M.; FONSECA, M.E.F.; HAGLER, A.N.; HAGLER, L.C.M. Avaliação do impacto ambiental causado por uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens* e sua ação como promotora de crescimento vegetal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBCS, 1995. p.50-543.

BOTELHO, G. R.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças**. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 2006. 31p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 211).

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v.66, p.1-12, 1999.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.

BROWN, E. G.; BARMORE, C. R. The effect of ethylene on susceptibility of Robinson tangerines to anthracnose. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, p.120-123, 1977.

BURGES, A. Influencia del hombre sobre los microorganismos Del suelo. In: INTRODUCCION a la microbiologia del suelo. Zaragoza: Acriba, 1960. 199p.

BURR, T. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Cleveland, v.2, n.1, p.1-20, 1985.

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**, Saint Paul, v. 68, p.1377-1383, 1978.

CALÇA, S. A.; COLLETTI, L.A.; LUCCHESI, A.A.; DODO, S. Influência do ácido cloroetil-fosfônico nos parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) variedade NA56-79. **STAB**, Piracicaba, v.2, n.4, p.25-28, 1984.

CAMPANHÃO, J. M. Rendimentos agroindustriais médios obtidos com aplicação comercial de ethrel. In: ENCONTRO ETHREL CANA-DE-AÇÚCAR, 4, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Rhodia, 1995. p.59-60.

CAMPOS, H. **Estatística Experimental Não-Paramétrica**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, 1983. 4 edição.349p.

CAMPOS, M. F.; ONO, E.O.; LIMA, G.P.P.; RODRIGUES, J.D. Desenvolvimento de plantas de soja em resposta aos reguladores vegetais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.2, p.9-11, 2007.

CAMPOS, M. S. A utilização de Ethrel em escala comercial na açucareira Corona S/A- Usina Bonfim. In: ENCONTRO CANA-DE-AÇÚCAR, 2., 1963, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Rhodia, 1963. p. 93-104.

CASTRO JUNIOR, J. V.; SELBACH, P.A.; ZÁCHIAAYUB, M.A. Avaliação do efeito do herbicida Glifosato na microbiota do solo. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.6, p.21-30, 2006.

CASTRO, P. R. C. Inibidores da florescência e estimulantes da maturação da cana-de-açúcar. In: ENCONTRO CANA-DE-AÇÚCAR, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Rhodia Agro, 1992. p. 87-91.

CASTRO, P. R. C. Reguladores vegetais em cana-de-açúcar. In: Produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1993. p. 209-225.

CASTRO, P. R. C. Maturadores químicos em cana-de-açúcar. **Saccharum**, São Paulo, n.1, p.12-16, 1999.

CASTRO, P. R. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Efeito de reguladores vegetais no desenvolvimento e na produtividade do amendoineiro

(*Arachis hypogaea* l.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.2, p. 176-184, 1993.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, Campinas, v.1, n.1, p.231-234, 2000.

CHANDRA, S.; CHOURE, K.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotium* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.124-130, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 23 jan. 2008.

DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.;, BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. Strain to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.2, p. 201-210, 1999.

DE LA FUENTE, L. ; MAVROID, D.V.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Utilization of trehalose, benzoate, valerate, and seed and root exudates by genotypes of 2,4-diacetylploroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.11, p.2712-2722, 2007.

DEUBER, R. Maturação da cana-de-açúcar na região Sudeste do Brasil. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Centro de Tecnologia COPERSUCAR, 1988. p.33-40.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G.J.A.; VIEIRA JÚNIOR, P.A.; MANFRON, P.A.; MARTIN, T.N.; BONNECARRÉRE, R.A.G.; CRESPO, P.E.N. Aplicação e influência do fitoregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.11, n.1, p.93-102, 2004.

DROBY, S.; COFFEY, M. D. Biodegradation process and nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v.118, p.543-553, 1991.

FANCHIELO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2. ed. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1995. 178p.

FERNANDES, A. A. H.; RODRIGUES, J. D.; RODRIGUES, S. D. Ação do Agrostemin sobre a altura e o número de folhas de plantas de soja (*Glycine Max* L. MERRIL cv. IAC-8). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.1, p.6-12, 1993.

FERREIRA, E. A.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; REIS, M.R. Glyphosate no controle de biótipos de azevém e impacto na microbiota do solo. *Planta Daninha*, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.573-578, 2006.

FRANKENBERGER JUNIOR, W. T.; ARSHAD, M. Ethylene. In: \_\_\_\_\_. (Ed.), **Phytohormones in soils: microbial production and function**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.301-435.

FRANKENBERGER JUNIOR, W. T.; POTH, M. Biosynthesis of indole-3-acid by pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Applied Environmental Microbiology**, n. 53, p.2908-2913, 1987.

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

FREITAS, L. Rizobactérias versus nematóides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 2001, Bento Gonçalves. **Anais ...** Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2001, v.1, p.25-35.

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.369-374.

FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.27, p.61-70, 2003.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.17, p.105-112, 1991.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plantas de algodoeiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, n.23, p.36-41, 1997.

FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.28, n.26, 2004.

FRENCH, E. R.; HEBERT, T. T. **Métodos de investigação fitopatológica**. San José: Editorial IICA, 1980. 289p.

GAMLIEL, A.; KATAN, J. Involvement of fluorescent pseudomonads and others microorganisms in increased growth response of plants in solarized soils. **Phytopathology**, Saint Paul, v..81, n.5, p. 494-502, 1991.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, n.9, p.886-891, 1993.

GONÇALVES, M. B. **Efeito da giberelina e ethephon no crescimento inicial, nutrição mineral, morfologia e anatomia da cana-de-açúcar.** 1984. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric setimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.26,p. 192-195, 1951.

GRIGOLLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectiva do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, v.30, p. 155-165, 2000.

HALE, H. G.; MOORE, L. D.; GRIFFIN, C. J. Root exudates and exudation. In: DOMMERGUES, Y. R.; KRUPA, S. V.(Ed.). **Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants.** New York: Elsevier Scientific Publishing, 1978. p.163-203.

HISLOP, E. C.; ARCHER, S. A.; HOAD, G. V. Ethylene production by healthy and *Sclerotinia fructigena* infected apple peel. **Phytochemistry**, New York, v.12, p. 2081-2086, 1973.

HUBER, D. M.; SEELY, C. I.; WATSON, R. D. Effects of the herbicide diuron on foot rot of winter wheat. **Plant Disease Report**, n.50, p.852-1966.

HUMBERT, R. H. Potassium builds sugarcane quality. **Better Crops with Plant Food**, Atlanta, n. 1, p. 28-29, 1968.

KEEL, C.; WELLER, D.M.; NATSCH, A.; DEFAGO, G.; COOK, R.J.; THOMASHOW, L.S. Conservation of 2,4 diacetylphoroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strain from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.552-563, 1996.

KENDE, H.; BAUMGARTNER, B. Regulation of aging in flowers of *Ipomoea tricolor* by ethylene. **Planta**, Berlin, n. 116, p. 279-289, 1974.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal Laboratory of the Clinical Medicine**, v.44, n.2, p.301-307, 1954.

KLOEPPER, J.W. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In: BLAINE, J.; METTING, F. (Ed.). **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 255-274.

KLOEPPER, J. W.; McINROY, J. A.; BOWEN, K. L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant and Soil**, The Hague, n.139, p.85-95, 1992.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N.; MILLER, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on

potato development and yield. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, n.11, p.1078-1082, 1980.

LAC-BUENDIA, J. P. Efeito de doses de reguladores de crescimento no algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.1, n.1, p.109-113, 1989.

LAMAS, F. M. Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloro de chlormequat aplicados no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.36, n.2, 2001.

LEONEL, S.; PEDROSO, C. J. Produção de mudas de maracujazeiro-doce com o uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.27, n.1, 2005

LEWICKI, P.; HILL, T. **Statistic: methods and applications**. Tulsa: StatSoft, 2005.

LOCKHART, L. C.; FORSYTH, F. R.; EAVES, C. V. Effect of ethylene on development of *Gloeosporium album* in apple and growth of the fungus in culture. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.48, p.557-559, 1968.

LUCCON, C. M. M.; MELO, I. S. Efeito da bacterização de sementes no desenvolvimento de plantas de milho e no controle de *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.23, 2000.

LUCHESI, A. A.; FLORÊNCIO, A.C.; GODOY, O.P.; STUPIELLO, J.P. Influência do ácido 2-chloroetil fosfônico na indução de perfilhamento em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) variedade NA 56-79. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 93, n.4, p.19-27, 1979.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.

LUZ, W. C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.597-600, 2001.

MACEDO, E. C.; AZEVEDO, D. A. Efeito de herbicidas no desenvolvimento “in vitro” de *Rhizoctonia solani* (Kuehn) e *Colletotrichum gossipii* (South). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.57, n.12, 1990.

MACEDO, E. C.; BLANCO, H. G.; CHIBA, S. Efeito de herbicidas residuais no desenvolvimento “in vitro” do fungo causador da fusariose de algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.50, n.5, p.103-113, 1984.

MACEDO, E. C.; CHIBA, S. Influência de herbicidas residuais no crescimento *in vitro* de *Verticillium albo-atrum* (Reinke & Berth) causador da murcha do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.51, n.11, p.285-290, 1985.

MACHADO, A. A.; ZONTA, E. P. **Manual do Sanest**: sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1991. 102 p.

MADAN, V. K.; SHIVAPURI, S.; PANDE, H.P.; SAXENA, Y.R. Activity of invertase in sugar-cane leaves. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 82, n. 55, 1980.

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de

cultura e casa-de-vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.41, n.2, p.285-291, 2006.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.; GOMES, A.M.A. Promoção de crescimento por bactérias. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE, 2000. p.133-137.

MARTEESON, A. M. Effects of agrochemical and heavy metals on fast growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.24, p.345-445, 1992.

MARTIN, J. P. Use de acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.69, n.3, p.215-232, 1950.

MARTINS, A. ; KIMURA, O.; RIBEIRO, R. L.D.; BALDANI, J.I. Efeito da microbiolização de sementes com rhizobactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* sobre a “murcha fusariana” do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 69-75, 2003.

MELO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso. In: MELLO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

MELLOTTO, E.; CASTRO, P.R.C.;GODOY, O.P.; CÂMARA, G.M.S.; STUPIELLO, J.P.; IEMMA, A.F. Desenvolvimento da cana-de-açúcar cultivar NA 56-79, proveniente de propagação de colmos tratados com ethephon. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”**, Piracicaba, n. 44, n.1, p.657-676. 1987.

MENEGHIN, S. P. **Declínio de produção e a síndrome do amarelecimento foliar na variedade de cana-de-açúcar SP71-6163.** 1997. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

MEYER, J. M.; ABDALLAH, M. A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. **Journal of General Microbiology**, London, v.107, p.319-328, 1978.

MEYER, J. M.; LINDERMAN, R. G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promotion bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.18, n.2, p. 185-190, 1986.

MICHNIEWICZ, M.; CZERWINSKA, E. Effect of ethrel on the growth of *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. in dixenic cultures with other fungi isolated from the root zone of wheat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.13, n.3, p.191-197, 1991.

MILLHOUSE, D. E.; MUNNECKE, D. E. Increased growth of *Nicotiana glutinosa* as partially to accumulation of ammonium-nitrogen in soil fumigated with methyl bromide. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.8, p. 793-797, 1979.

MILLIKAN, D. F.; FIELDS, M. L. Influence of some representative herbicidal chemicals upon the growth of some fungi. **Phytopathology**, n.54, p.901, 1964.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA, 2002. 626p.

MORETINI, A. **Impacto do fungicida metalaxil sobre a comunidade e atividade enzimática do solo**. 2000. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MORGAN, T.; McDONALD, L.; JACKSON, P.; HOLTUM, J. Changes in sugar content of Australian sugarcane cultivars after application of chemical ripeners. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE, 10., 2001, Horbat. **Proceedings of the...** Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/asa/2001/2/d/morgan.htm>> Acesso em: 23 jan. 2008.

MUTTON, M. J. R. Efeitos de maturadores em cana-de-açúcar sobre a qualidade da matéria-prima. **STAB**, Piracicaba, v.16, n.4, p.20-21, 1998.

NAGASHIMA, G. T.; MARUR, C.J.; YAMAOKA, R.S.; MIGLIORANZA, E. Desenvolvimento de plantas de algodão provenientes de sementes embebidas em cloreto de mepiquat. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.40, n.9, p.943-946, 2005.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, n.5, n.1, p.1-20, 1997.

NIETO, K. F.; FRANKENBERGER JUNIOR, W. T. Biosynthesis of cytokinins produced by *Azotobacter chroococcum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, n. 21, p.967-972, 1989.

NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N.N.; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D.; PEREIRA, G.E.; MOTA, J.H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.533-541, 2001.

PAGGIARO, C. M. Resultados da aplicação de Ethrel em escala comercial na Usina de Barra S.A- Açúcar e Álcool. ENCONTRO DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2., 1992, São Paulo. **Anais ...** São Paulo:Rhodia, 1993. p.105-108, 1992.

PAGGIARO, C. M. Aplicação de maturador ethrel em cana-de-açúcar, resultados comerciais de 1994. ENCONTRO ETHREL CANA-DE-AÇÚCAR, 4., 1994, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Rhodia, 1995. p.56-58.

PAGGIARO, C. M.; GERALDI FILHO, L.; ALBUQUERQUE, F.C.; BAGLIONI, B.M. Ethrel na germinação e perfilhamento da cana-de-açúcar. ENCONTRO ETHREL CANA-DE-AÇÚCAR, 4., 1994, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Rhodia, 1995. p.10-12.

PAN, B.; VESSEY, J. K.; SMITH, D. L. Response of Field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* on *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-inocubated with genistein. **European Journal of Agronomy**, v.17, p.143-153, 2001.

PARR, J. F. Effects of pesticides on microorganisms in soil and water. In: GUENZI, W. D. **Pesticides in soil and water**. 2.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1981. p.315-340

PASCHOLATI, S. F. Fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO; A. et al. (Ed). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica, 1995. p.365-393.

PMGCA. Catálogo RB. Disponível em <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/htm/catal/catvaried.php>. Acesso em: 09 mar. 2008.

PRADO NETO, M.; DANTAS, A.C.V.L.; VIEIRA, E.L.; ALMEIDA, V. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador vegetal e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.3, p.693-698, 2007.

RIDGE, E. H. Studies on soil fumigation II: effects on bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, n.4, p.249-253, 1976.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia de cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 99p.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A.D.; TEIXEIRA, M.C.C.; ROMAN, E.S. **Redutores de crescimento**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. 18p. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online, 14) Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p\\_ci14.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p_ci14.htm)>. Acesso em: 23 jan. 2008.

ROSALES, R.; GARRIDO, R.; RAMOS, P.; RAMOS, J.M. Ethylene can reduce *Prays oleae* attack in olive trees. **Crop Protection**, v.25, n.2, p.140-143, 2006.

ROVIRA, A. D. Plant root exudates. **Botanical Review**, Bronx, n.35, p.35-57, 1969.

ROVIRA, A. D.; DAVEY, C. B. Biology of the rhizosphere. In: CARSON, E. W. (Ed). **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p.153-204.

ROVIRA, A. D.; VENDRELL, M. Ethylene in sterilized soil. Its significance in studies of interactions between microorganisms and plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, n.4, p.63-69, 1972.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R.L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v.32, n.2, p.1-8, 2005.

SANTOS, T. M. C.; MONTEIRO, R. T. R. Número de microrganismos e atividade da urease na presença de aldicarbe e endosulfan no solo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, n.1, p.123-130, 1994.

SILVA, C. M. M.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; MIRANDA, G.V. Root exudation of imazapyr by eucalypt cultivated in soil. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.109-116, 2004.

SILVA, M. A; GAVA, G. J. C.; CAPUTO, M. M.; PINCELLI, R. P.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S. Uso de reguladores de crescimento como potencializadores do perfilhamento e da produtividade em cana-soca. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.545-552, 2007.

SILVA, M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.15, p.93-104, 2005

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M. Antagonismo de *Bacillus* spp. contra *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.605-612, 1995.

SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.217-221, 2004.

SIMEONI, L. A.; LINDSAY, W.L.; BAKER, R. Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.7, p.1057-1061, 1987.

SIQUEIRA, J. O. **Biologia do solo**. Lavras: ESAL, 1993. 230p.

SMITH, A. M. Ethylene as a cause of soil fungistasis. **Nature**, London, v.246, p. 311-313, 1973.

SMITH, A. M. Ethylene production by bacteria in reduced microsites in soil and some implications to agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.8, p.293-298, 1976a.

SMITH, A. M.; COOK, R. J. Implication of ethylene production by bacteria for biological balance of soil. **Nature**, London, v 252, p.703-705, 1974.

SMITH, W. H. Character and significance of forest root exudates. **Ecology**, Tempe, v.75, n.2, p.324-331, 1976b.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Campinas, v.20, n.2, p.225-234, 2006.

SPERBER, J. I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.9, p.778-781, 1958.

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.18-23, 2002.

SUSLOW, T. W.; SCHROTH, M. N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n.1, p.111-115, 1982.

SYNGENTA. Disponível em: <http://www.syngenta.com.br/cs/index.asp>  
Acesso em: 23 jan. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.517-540.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D.M.; BONSAII, R.F.; PERSON III, L.S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere on wheat. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.908-912, 1990.

TUFFI SANTOS, L. D. , JAKELAITIS, A.; SILVA, A.A.; VIVIAN, R.; COSTA, M.D.; SILVA, A.F. Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.26, p.143-152, 2005.

VANCURA, V.; KUNC, F. Microorganisms, their mutual relations and functions in the rhizosphere. In; \_\_\_\_\_. (Ed.). **Soil microbial associations: control of structures and functions**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p.193-280.

VENÂNCIO, W. S.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Efeito da solarização e do brometo de metila sobre a comunidade de fungos do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.32, n.2, p.183-185, 2006.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p. 222-228, 2001.

VIEIRA, E. L.; SANTOS, C. M. G. Estimulante vegetal no crescimento e desenvolvimento inicial do radicular do algodoeiro em rizotrons. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais...** Disponível em: <[www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/161.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/161.pdf)>. Acesso:em: 23 jan. 2008.

VIEIRA, I. M. S. **Relações entre níveis de açúcares e atividades de invertase em tecidos de quatro cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) cultivadas a campo**. 1988. 129 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

WELLER, D. M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.

WELLER, D. M. ; LANDA, B.B., MAVRODI, O.V., SCHROEDER, L., DE LA FUENTES, BANKHEAD, S.B., MOLAR, R.A., BONSALL, R. Role of 2,4-diacetylphoroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in defense of plant roots. **Plant Biology**, Stuttgart, v.9, p.4-20, 2007.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strain of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, n.12, p.1508-1512, 1991.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. ***Pseudomonas spp.*** fluorescentes bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).