SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ANTAGÔNICAS A
Erwinia carotovora E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
DE PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

GLEUSA MARIA MANTOVANELLO LUCON

Bióloga

Orientador: Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração
Microbiologia Agrícola

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

L941s Lucon, Cleusa Maria Mantovanello
Seleção de rizobactérias antagônicas a Erwinia caroto-
vora e promotoras de crescimento de plantas de tomate
(Lycopersicon esculentum Mill.). Piracicaba, 1992.
120p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria para controle biológico 2. Bactéria como
estimulante do crescimento 3. Tomate - Crescimento - Esti-
mulante I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Piracicaba

CDD 634.642
589.9

SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ANTAGÔNICAS A ERWINIA CAROTOVORA E PROMOTORAS
DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE (LYCOPERSICON SCULENTUM, MILL.)

CLEUSA MARIA MANTOVANELLO LUCON

Aprovada em: 28/04/1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

EMBRAPA/CNPDA

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

ESALQ/USP

Dr. Pedro José Valarini

EMBRAPA/CNPDA

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

Orientador

ao Oswaldo

OFEREÇO

aos meus pais, Valentim e Leontina

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- ao Dr. Itamar Soares de Melo, pela dedicação e amizade;

- a Deniza Palazzo e Maria Lígia Veiga de Carvalho, pela amizade e confiança depositada;

- aos amigos Antonio Carlos Ferreira da Silva, Ila Cardim Rêgo, Maria Sebastiana da Silva e Eri Saito, pela amizade, carinho e sugestões ao trabalho;

- aos amigos do Departamento de Genética da ESALQ: Ana, Tânia, Gerson, Carlos, Oberdan, Fernando, Carmen, Márcia, Neusa, João, Lolo, Lurdes, Rui e José, pela amizade e colaboração na condução do trabalho;

- ao Departamento de Genética da ESALQ, pela oportunidade do uso de suas instalações e material para a realização do trabalho;

- ao Departamento de Fitopatologia do Instituto Biológico de Campinas, pela cessão do isolado bacteriano de *Erwinia carotovora*;

- a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho.

SUMARIO

página

RESUMO	vi
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Microrganismos antagonistas no controle biológico	4
2.2. Microrganismos da Rizosfera	5
2.3. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP	8
2.3.1. Mecanismos da promoção de crescimento de plantas	12
2.3.2. Seleção de uma rizobactéria antagonista	16
2.3.3. Formulação de agentes para o biocontrole	19
2.3.4. Fatores bióticos e abióticos relacionados com a eficiência de rizobactérias.....	20
2.4. Proteção biológica de órgãos de propagação de plantas	24
2.5. Mecanismos de biocontrole	26
2.5.1. Competição	27
2.5.2. Antibiose	30
2.6. Proteção biológica contra Erwinia carotovora	32

2.7. Colonização de raízes	36
2.7.1. Processo de colonização de raízes	38
2.7.2. Fatores que afetam a colonização	39
3. MATERIAL E METODOS	44
3.1. Local de execução	44
3.2. Substrato	44
3.3. Isolamento de rizobactérias	45
3.4. Isolado de <i>Erwinia carotovora</i>	47
3.5. Preservação das bactérias	47
3.6. Inoculação das sementes	48
3.7. Teste de antagonismo "in vitro"	48
3.7.1. Experimento I - Produção de antibióticos	48
3.7.2. Experimento II - Produção de sideróforos	49
3.8. Teste de antagonismo "in vivo"	50
3.8.1. Experimento III - Avaliação da severidade de <i>Erwinia carotovora</i> em tubérculos de batatas comerciais	50
3.9. Teste de promoção de crescimento de plantas em casa-de-vegetação	52
3.9.1. Experimento IV - Solo não autoclavado .	52
3.9.2. Experimento V - Solo autoclavado	53
3.10. Avaliação da capacidade de colonização de raízes pelos mutantes (Rif ⁺ e Anal ⁺)	54
3.10.1. Preparo das soluções estoques de antibióticos	54

3.10.2. Marcação genética dos isolados para resistência a antibióticos	54
3.10.3. Levantamento da ocorrência natural de resistência aos antibióticos rifampicina e ácido nalidíxico	55
3.10.4. Experimento VI - Monitoramento da colonização dos mutantes (Rif+, Anal+) em raízes de plantas de tomate	56
3.11. Delineamento experimental e análise estatística	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Experimentos I e II - Atividade antagonista das rizobactérias isoladas "in vitro"	58
4.2. Seleção de antagonistas "in vivo"	64
4.3. Experimentos IV e V - Seleção de isolados promotores de crescimento em casa-de-vegetação	74
4.4. Seleção de mutantes naturais de alguns isolados para resistência a antibióticos e avaliação da ocorrência natural da resistência	86
4.5. Experimento VI - Avaliação da capacidade de colonização de mutantes (Rif+ e Anal+)	87
5. CONCLUSÕES	92
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94

SELEÇÃO DE RIZOBACTERIAS ANTAGONICAS A
Erwinia carotovora E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
DE PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon sculentum*, Mill.)

Autora: CLEUSA MARIA MANTOVANELLO LUCON

Orientador: Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo selecionar rizobactérias antagônicas à *Erwinia carotovora* (Ec) e promotoras de crescimento de plantas de tomate.

Isolados com diferentes características morfológicas obtidos do rizoplane de raízes de cenoura foram inicialmente testados "in vitro" para a inibição de Ec em meios BDA (batata-dextrose-ágar) para a produção de substâncias antibióticas, e KB (B de King) para a produção de pigmentos fluorescentes (sideróforos).

Os resultados obtidos na seleção dos 193 isolados bacterianos, quanto à antibiose "in vitro" foram assim quantificados: 71 isolados (37% do total) antagonistas a Ec em meio BDA, e 23 (12% do total) em meio KB. A amplitude de variação dos halos de inibição foi de 0,6 - 1,7 cm de diâmetro em BDA e 0,6 - 1,2 cm em KB.

Posteriormente, os 94 isolados selecionados "in vitro" foram utilizados em testes de antagonismo a *Ec* em tubérculos comerciais de batata. Observou-se então que, destes isolados, 41 (ou 44% do total) foram capazes de diminuir a severidade do ataque da bactéria, sendo que 7 destes diminuíram de forma significativa a porcentagem de perda de peso dos tubérculos comerciais, em relação ao controle.

Em testes para promoção de crescimento de plantas de tomate em condições de casa-de-vegetação, verificou-se que, dos 41 isolados bacterianos testados e selecionados pela inibição de *Ec* em tubérculos comerciais, 15 apresentaram resultados satisfatórios em 3 testes consecutivos. Foi observado um aumento no crescimento de plantas (em g de peso seco), tanto em solo autoclavado como em não-autoclavado. Os aumentos na parte aérea das plantas foram de até 139% (para o isolado L4/11) em solo autoclavado e de até 44% (isolado 23) em solo não-autoclavado.

Também foi observado que os isolados que inibiram de maneira mais efetiva a porcentagem de perda de peso em tubérculos de batatas comerciais foram aqueles que promoveram os maiores crescimentos relativos de plantas em casa-de-vegetação. Todavia, o mesmo não foi observado em relação ao tamanho do halo de inibição a *Ec* "in vitro".

Nos testes de colonização com mutantes antibióticos negativos com dupla marca (resistência à

rifampicina e ao ácido nalidixico), observou-se que, dos 4 isolados estudados, apenas um permaneceu nas raízes um mês após a emergência das plantas, com uma população em ufc/g de raízes $1,1 \times 10^5$, peso fresco, com uma redução significativa em relação ao inóculo inicial. Graficamente, estas reduções estabeleceram curvas muito próximas a uma reta log-normal.

SELECTION OF ANTAGONISTIC RHIZOBACTERIAS
TO *Erwinia carotovora* AND ENHANCED
TOMATO PLANTS (*Lycopersicon esculentum*, Mill.)

Author: CLEUSA MARIA MANTOVANELLO LUCON

Adviser: Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

SUMMARY

This paper had for objective to select bacterial strains with ability to control the severity of *Erwinia carotovora* (Ec) in commercial potatoes and enhance tomato plants growth in greenhouse conditions.

Isolates obtained from the rhizoplane of carrot roots were initially tested "in vitro" to inhibit Ec in PDA (or potato-dextrose-agar) medium, producing antibiotic substances, and KB (or King's B), producing fluorescent pigments.

The results obtained in the selection of 193 bacterial isolates, from several sources, for antibiosis "in vitro" were: 71 isolates (37% of total) antagonistic to Ec in PDA medium and 23 (12% of total) in KB medium. The amplitude of variation of inhibition zone were from 0,6 to

1,7 cm diameters in FDA and from 0,6 to 1,2 cm in KB medium.

The 94 "in vitro" selected isolates were used in antagonism tests to *Ec* in commercial tubers. It was observed that 41 isolates from the whole (or 44%) were capable to diminish the severity of bacterium attack, 7 of them diminishing in a significant form the weight-loss percentage of commercial tubers, related to the control.

In the enhanced tomato plants growth tests in greenhouse, from 41 isolates tested and selected by inhibition to *Ec* in commercial tubers, 15 bacteria have presented satisfactory results in 3 consecutive tests. A plant growth increase was observed (in g, dry weight), as in autoclaved soil as in nonautoclaved. The increases of plants shoot were up to 139% (isolate L4/11) in autoclaved soil and up to 44% (isolate 23) in nonautoclaved soil.

It was also observed that the isolates which have most effectively inhibited the commercial tubers were those which have promoted the highest relative enhances in greenhouse; though, the same was not observed "in vitro" related to the length of *Ec*'s inhibition zone

In colonization tests with negative double-market antibiotic mutants (to rifampicin and nalidixic acid), it was observed that, from 4 studied isolates, just one remained on the roots, a month after the plants emergence, with a population of $1,1 \times 10^5$ cfu/g of fresh roots, with a significant reduction, related to the initial

inoculum. Graphically, these reductions determined curves similar to a log-normal distribution.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de rizobactérias visando o controle de patógenos, a promoção do crescimento de plantas e, conseqüentemente aumento da produção, tem recebido bastante atenção recentemente.

Entre os patógenos maiores, as bactérias do gênero *Erwinia* destacam-se em importância porque causam várias doenças como podridão mole, canela preta, talo oco e murcha. Podem atacar diversas espécies de plantas durante todas as fases da cultura, bem como durante o armazenamento, o transporte e a comercialização dos produtos colhidos.

As perdas variam bastante e são influenciadas por condições climáticas, espécie e/ou subespécie da bactéria envolvida, potencial de inóculo, condições de cultura e pós-colheita. Para o controle destas, muitos métodos têm sido utilizados, embora nenhum tenha sido satisfatoriamente eficiente.

O controle biológico é um método bastante atrativo no combate de doenças, tendo recebido recentemente bastante atenção devido à ineficiência dos produtos químicos geralmente aplicados no controle de patógenos e

aos problemas ambientais causados pelos resíduos destes produtos.

Alguns trabalhos relatam o controle de *Erwinia carotovora* com a aplicação de bactérias antagonistas em batatas, antes e depois do plantio.

O maior problema no desenvolvimento de sistemas de controle biológico é a seleção dos isolados com potencial para o biocontrole. Isto é atribuído ao grande número de bactérias que deve ser testado para a obtenção de poucas que terão habilidade na supressão de microrganismos deletérios. Segundo alguns pesquisadores, somente 2 a 5% de isolados bacterianos do sistema radicular causam respostas positivas no crescimento de plantas.

Vários estudos demonstram que inoculando sementes, tubérculos ou raízes com rizobactérias aumenta-se efetivamente o crescimento destas plantas, embora o mecanismo exato deste efeito ainda seja desconhecido. Estas bactérias são denominadas de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP).

Muitos são os mecanismos estudados e possíveis para a promoção do crescimento de plantas, como: produção de antibióticos, capazes de inibir o crescimento de patógenos maiores e menores na rizosfera de plantas; produção de sideróforos, agentes quelantes com alta afinidade por Fe^{3+} , produzidos em baixas concentrações do elemento, tornando-o indisponível a outros microrganismos; produção de substâncias reguladoras do crescimento de

plantas como giberelinas, auxinas e citoquininas; e aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas como, por exemplo, fósforo e nitrogênio.

Por estes motivos, o objetivo deste trabalho foi o de selecionar isolados rizobacterianos antagonistas a *Erwinia carotovora* e promotores de crescimentos de plantas de tomate, em laboratório e casa-de-vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos antagonistas no controle biológico

O controle biológico é definido como "a redução da quantidade de inóculo ou da atividade promotora da doença de um patógeno, realizado por ou através de um ou mais organismos excluindo o homem" (Baker & Cook¹, 1974 citado por COOK & BAKER, 1983).

Entre os organismos capazes de realizar o controle biológico de fitopatógenos encontram-se os antagonistas, que são definidos como agentes biológicos com potencial para interferir na sobrevivência ou na atividade promotora dos fitopatógenos (COOK & BAKER, 1983).

A utilização de microrganismos antagonistas no biocontrole é estudada há mais de 69 anos. A primeira tentativa na introdução de antagonistas foi feita por C. Hartley² em 1921 (citado por BAKER, 1987), que infestou solos de viveiros com 13 fungos antagonistas, visando o controle de "damping-off" causado por *Pythium debaryanum*. O

1 - BAKER, K.F. & COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. St. Paul. American Phytopathology Society, 433p., 1974

2 - HARTLEY, C. Damping-off in forest nurseries. U.S. Depto. Agric. Bull, 934:1-99, 1921.

autor verificou que, em solo autoclavado e infestado com *P.debaryanum*, ocorreram 27,5% de doença, enquanto que, quando adicionados fungos saprófitas, ocorreram 16,9% de "damping-off". Os antagonistas, na ausência de *Pythium*, ocasionaram 11,1% da doença. Em outro experimento, o mesmo autor observou que em solo de viveiro não tratado e infestado com *Pythium* ocorreram 35,8% de doença e, em solo autoclavado, 100% da doença. Com esses experimentos, o autor verificou a importância da competição natural entre os fungos para a ocorrência da doença.

2.2. Microrganismos da rizosfera

A rizosfera apresenta um número elevado de microrganismos saprófitas, onde são incluídos elementos deletérios e benéficos que possuem potencial para influenciar o crescimento das plantas e, conseqüentemente, a produção (CHET et alii, 1990).

Os microrganismos da rizosfera são classificados em benéficos, prejudiciais e neutros de acordo com os efeitos que causam às plantas. Os microrganismos prejudiciais são divididos ainda em patógenos menores e maiores (ou verdadeiros), de acordo com os sintomas de doença apresentados pela planta (SCHIPPERS et alii, 1987).

Na categoria dos patógenos menores encontramos os microrganismos deletérios da rizosfera (MDR), que afetam as plantas através dos metabólitos que produzem, sem parasitar os tecidos, como as rizobactérias e rizofungos deletérios (SUSLOW & SCHROTH, 1982a). Já os patógenos maiores ou verdadeiros, causam sintomas típicos de doença.

A patogenicidade de MDR é difícil de ser demonstrada, porque seus efeitos nas plantas geralmente ficam restritos ao retardamento de crescimento de raízes e/ou brotos, sem outros sintomas distintos (BAKKER et alii, 1987).

SUSLOW & SCHROTH (1982a) observaram que os efeitos causados pela inoculação de rizobactérias deletérias em sementes de beterraba foram uma redução em sua germinação, um decréscimo de mais de 48% nos pesos fresco e seco das plantas e, nas raízes, lesões, distorções, redução do alongamento e um aumento na infecção por fungos. Os isolados testados foram *Enterobacter* spp., *Arthrobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., entre outros.

Bactérias deletérias possuem efeitos prejudiciais às plantas devido à produção de substâncias que afetam a permeabilidade das células nas raízes ou interferem em seus processos fisiológicos. Podem também afetar negativamente o crescimento de plantas pela alteração no suprimento de íons, água e substâncias de

crescimento, ou ainda pela alteração das funções e/ou limitação do crescimento da raiz (SCHIPPERS et alii, 1987).

LOPER E SCHROTH (1986) observaram em culturas filtradas de linhagens bacterianas uma relação significativamente linear entre o acúmulo de ácido indol-acético (IAA) e o comprimento da raiz primária de plantas de beterraba. Os resultados obtidos, quando inoculadas duas linhagens produtoras de altas concentrações de ácido indol-acético, foram um decréscimo no comprimento da raiz primária e um aumento na proporção entre brotos e raízes, quando comparados ao controle.

McDOUGALL (1970) observou que a exsudação de compostos orgânicos a partir de raízes de trigo aumentou dez vezes, quando potássio cianida (1 mM) foi adicionado à solução de cultura. Segundo ROVIRA (1969), o aumento na exsudação de raízes, na presença de cianida, pode ser devido ao aumento na permeabilidade das células das raízes ou, alternativamente, a uma atividade metabólica alterada resultante da deficiência energética.

ALSTRON E BURNS (1989) estudaram isolados bacterianos produtores de cianida em diferentes variedades de alface; observaram que os mesmos induziram diferenças significativas no crescimento de raízes e concluíram que estas diferenças foram devidas à sensibilidade das plantas à cianida.

O efeito do HCN é o de inibir a citocromo oxidase e, desta forma, afetar negativamente o metabolismo energético da raiz (SCHIFFERS et alii, 1990).

A sensibilidade diferencial das plantas ao hidrogênio cianida deve ser devido às diferentes habilidades em utilizar uma via respiratória alternativa, já que ocorre inibição da citocromo oxidase (ASTROM, 1991).

Ao contrário dos microrganismos deletérios, os microrganismos benéficos, simbiotes e não simbiotes, proporcionam aumentos na disponibilidade e absorção de nutrientes minerais (KAVIMANDAN & GAUR, 1971 e LIFSHITZ et alii, 1987) ou produzem substâncias para o crescimento de plantas, como giberelinas e auxinas (KATZNELSON & COLE, 1965; BROWN et alii, 1968; BROWN, 1972; LOPER & SCHROTH, 1986) e, na grande maioria dos casos, suprime o crescimento de microrganismos deletérios na rizosfera de plantas (KLOEPFER & SCHROTH, 1981c; XU & GROSS, 1986 a e b; ELAD et alii, 1987).

2.3. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP

O termo rizobactéria foi criado para descrever as bactérias que possuem habilidade em colonizar agressivamente o sistema radicular (SCHROTH & HANCOCK,

1981). Essas bactérias podem ser divididas em três grupos em relação aos efeitos causados às plantas: benéficos, prejudiciais e neutros (SCHIPPERS et alii, 1987).

A utilização de bactérias benéficas, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), visando o aumento de crescimento de plantas e, conseqüentemente, a produção, teve início na Rússia na década de '50 (KLOEPPER et alii, 1989). Contudo, somente na década de '60 respostas positivas no aumento de crescimento de plantas foram obtidas com a inoculação de *Azotobacter* em plantas de trigo, tomate e milho (ROVIRA, 1963; BROWN et alii, 1962 e BROWN et alii, 1964). O motivo do aumento no crescimento não ficou claro na época.

Mais tarde, BROWN et alii (1968) observaram a existência de ácido giberélico e ácido indol-acético em culturas de *Azotobacter* e sugeriram o possível efeito dessas substâncias no crescimento de plantas.

Outro gênero estudado como inoculante de sementes, *Clostridium* spp., demonstrou habilidade para promover crescimento em milho, tomate e trigo, com aumentos significativos de plantas (ROVIRA, 1963).

CHANG & KOMMEDAHL (1968) observaram que *Bacillus subtilis* inoculado em sementes de milho controlou *Fusarium roseum* fsp. *cerealis* "graminearum", aumentando a produção.

Na mesma linha de pesquisa, isolados de *Bacillus subtilis* e *Streptomyces griseus*, antagonistas a

Rhizoctonia solani, foram testados na produção de cereais e cenouras em campo. Foi observado um aumento na produção de cenouras de 48% quando aplicado *B. subtilis* e de 15% com a inoculação de *S. griseus*, quando comparados ao controle. Também houve um aumento na produção de grãos e de matéria seca dos cereais (MERRIMAN et alii, 1974)

TURNER & BACKMAN (1971) estudaram o efeito de *B. subtilis* na produção de amendoim. Observaram um aumento na produção de até 37% em relação ao controle, um incremento na emergência e germinação das sementes, um aumento na nodulação por *Rhizobium* spp., um aumento na nutrição de plantas, uma redução no nível de cancos nas raízes causados por *R. solani* e um aumento no crescimento da raiz.

PARKE et alii (1991) inocularam sementes de ervilha com *P. fluorescens* visando o controle de tombamento. Os resultados obtidos foram um aumento na emergência e na produtividade de em média 33%, comparando com outro tratamento onde foi utilizado apenas o fungicida captan.

KLOEPPER et alii (1980b) observaram que o tratamento de batatas-semente com o isolado B10 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes resultou em uma redução significativa de fungos no rizoplane de até 59% em relação às plantas-controle tratadas com água. KLOEPPER E SCHROTH (1981c) constataram uma redução na densidade da população de fungos e bactérias gram-positivas no sistema radicular

de 23 a 64% e 25 a 93%, respectivamente. O mesmo não ocorreu nas plantas controle tratadas com linhagens mutantes sem atividade de antibiose.

O aumento no crescimento da planta pôde ser atribuído a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos menores, os quais interferem negativamente no crescimento de plantas (KLOEPPER et alii, 1980b e KLOEPPER & SCHROTH, 1981c).

KLOEPPER & SCHROTH (1981b) inocularam sementes de rabanete em condições gnotobióticas e observaram que as plantas inoculadas não cresceram mais do que os controles tratados com água, embora tenha havido colonização das raízes. O mesmo não ocorreu em condições não estéreis, onde as plantas exibiram crescimento significativo (até 150%) comparadas ao controle. Concluíram que o aumento no crescimento foi devido à ação indireta pela interação com a microbiota nativa das raízes.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., fluorescentes, são as mais estudadas no biocontrole de doenças e na promoção de crescimento de plantas devido a características como: a grande habilidade para suprimir patógenos menores e maiores da rizosfera (WELLER, 1988); possuírem o solo como habitat natural, mais especificamente partículas de matéria orgânica e rizosfera (ROVIRA & SANDS, 1971); a ocorrência natural de elevadas populações (KLOEPPER et alii, 1980a; SUSLOW & SCHROTH, 1982b; XU & GROSS, 1986b); serem nutricionalmente versáteis e possuírem

habilidade de crescer sobre uma grande variedade de condições ambientais (SCHROTH E HANCOCK, 1982). Além destas vantagens, são capazes de produzir uma grande variedade de antibióticos (LEISINGER & MARGRAFF, 1979) e sideróforos (KLOEPPER et alii, 1980b e MISAGHI et alii, 1982), que podem inibir bactérias e fungos fitopatogênicos "in vitro" e "in vivo".

2.3.1. Mecanismos da promoção de crescimento de plantas

Raízes de plantas exsudam continuamente nutrientes que servem como alimento para os microrganismos do solo (BOWEN & ROVIRA, 1976).

Estudos da microbiota da rizosfera, região influenciada pelos exsudados do sistema radicular, permitiram a identificação de processos fisiológicos específicos, como a fixação de nitrogênio por bactérias que beneficiam a planta (KLOEPPER et alii, 1989).

Bactérias como *Azotobacter chroococcum*, *Rhizobium* spp. e *Azospirillum* fixam nitrogênio atmosférico e podem promover o crescimento de plantas significativamente, embora o mecanismo aceito como responsável por este efeito não seja apenas a fixação de nitrogênio (BROWN, 1974).

HUSSAIN et alii (1987) relataram um aumento na produção de milho da ordem de 16% em resposta à inoculação com *Azotobacter chroococcum*, em um experimento em campo onde foi aplicada uma grande quantidade de nitrogênio fertilizante. O efeito na produção foi sugerido ser devido à produção de hormônios de planta pela bactéria.

Outro mecanismo sugerido para a promoção de crescimento de plantas por bactérias benéficas é a mineralização de componentes orgânicos fosforosos, ou a solubilização dos componentes inorgânicos de fósforo (KLOEPPER et alii, 1989).

A promoção também pode ser atribuída à produção de substâncias reguladoras de crescimento, incluindo giberelinas, citoquininas e auxinas. Estas substâncias são produzidas por alguns microrganismos do solo em resposta ao metabolismo de exsudados específicos das raízes (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1989). BROWN (1972) estudou bactérias do rizoplane e rizosfera quanto à habilidade de produzir substâncias reguladoras de crescimento em trigo. Observou, através de cromatogramas, que muitas bactérias produziram reguladores de crescimento de plantas do tipo de giberelinas e auxinas quando crescidas em culturas líquidas.

LIFSHITZ et alii (1987) observaram através da utilização de fósforo marcado (^{32}P), que houve um aumento no nível de fósforo das raízes da ordem de 100,4% acima dos controles não inoculados com *P. putida* GR12-2. Na

parte aérea, o aumento foi da ordem de 123,4%. Houve correlação significativa entre o nível de ^{32}P nas raízes e o comprimento das mesmas e entre o comprimento da raiz e o nível de ^{32}P na parte aérea.

Além do fósforo e do nitrogênio, a bacterização também tem proporcionado o aumento de nutrientes nas plantas, como o boro e o potássio (TURNER & BACKMAN, 1991).

Outro efeito benéfico de RPCP inclui a supressão de microrganismos deletérios. Segundo alguns autores, a promoção de crescimento pode estar associada à mudança da composição da microbiota da rizosfera, pela substituição ou exclusão de componentes deletérios (SCHROTH & HANCOCK, 1981; SCHROTH & HANCOCK, 1982 e SUSLOW & SCHROTH, 1982b).

A produção de componentes tóxicos por RPCP como antibióticos e HCN , ativos contra rizobactérias deletérias, também tem sido proposta como um mecanismo de promoção de crescimento (WELLER, 1988)

Segundo VOISARD et alii (1989), o HCN produzido por bactérias, induz nas plantas alguns mecanismos de defesa contra patógenos. Contudo, o autor sugeriu que outros metabólitos, presumivelmente antibióticos, poderiam estar envolvidos nestes mecanismos.

Rizobactérias deletérias são os maiores componentes da microbiota em culturas comerciais de beterraba, feijão e alface, e são responsáveis em parte

pelo decréscimo de produção e aumento da suscetibilidade às infecções das raízes por fungos (SUSLOW & SCHROTH, 1982a).

Vários trabalhos relatam o aumento de crescimento de plantas pela inibição de MDR - microrganismos deletérios da rizosfera (BURR et alii, 1978; KLOPPER et alii, 1980b; SUSLOW & SCHROTH, 1982a) e contra patógenos maiores (CAPPER & CAMPBELL, 1986; XU & GROSS, 1986b e WELLER, 1983).

Um exemplo importante de supressão de patógenos maiores é o controle biológico de podridão do pé, uma doença de raiz de trigo causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. A podridão do pé é, provavelmente, a doença mais importante da cultura do trigo. Devido à falta de resistência da planta hospedeira e formas de controle químico econômico, o controle biológico, com a utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas*, tem sido extensivamente estudado (WELLER, 1988).

TURNER & BACKMAN (1991) observaram que a resposta mais favorável à inoculação com *B. subtilis* em sementes de amendoim ocorreu quando as plantas foram submetidas a condições estressantes como limitada disponibilidade de água, poucas práticas rotacionais, ou solos frios, causados por plantio antes da época apropriada. Observaram ainda um aumento ligeiramente maior da concentração de nutrientes nas plantas como boro, potássio e nitrogênio de 16,4 , 10,3 e 12,3% , respectivamente.

2.3.2. Seleção de rizobactéria antagonista

O maior problema no desenvolvimento de sistemas de controle biológico de doenças de raízes é a seleção de microrganismos benéficos, devido ao fato de que, apesar da existência de um grande número de bactérias que habitam o solo e a superfície das raízes de plantas, apenas um pequeno número de agentes possui potencial para o bioncontrole (RHODES & LOGAN, 1987).

SCHROTH & HANCOCK (1981) constataram que apenas 2 a 5% das bactérias isoladas dos sistemas radiculares proporcionaram resposta positiva ao crescimento de plantas. Por essa razão, um grande número de isolados devem ser testados para a obtenção de um pequeno número de linhagens benéficas.

A seleção de isolados bacterianos eficientes pode ser facilitada procedendo-se o isolamento das bactérias na mesma condição ambiental na qual serão utilizadas (BURR et alii, 1978).

Segundo SCHROTH & HANCOCK (1981), solos supressivos, onde um determinado patógeno de solo está ausente ou em baixa concentração, ocorrendo de forma natural ou após ter sido introduzido, podem ser ótimos locais para se proceder ao isolamento de antagonistas.

Os testes de seleção em campo são trabalhosos e necessitam de grande espaço para serem realizados. Em função disso, a seleção do antagonista pela inibição do patógeno "in vitro" é uma forma atrativa neste processo; contudo, alguns autores criticam este método pela falta de correlação entre os resultados de testes "in vitro" e experimentos "in vivo" por considerarem insatisfatório como processo de seleção (RHODES & LOGAN, 1987 e SUSLOW, 1982).

SUSLOW & SCHROTH (1982a) observaram que 30 das 84 rizobactérias testadas para promoção do crescimento de plantas de beterraba causaram antibiose "in vitro" contra pelo menos um dos fitopatógenos utilizados, embora não tenham sido capazes de promover o crescimento em casa-de-vegetação. Os autores concluíram que a produção de antibióticos "in vitro" não pode ser utilizada como único critério de seleção de RFCP.

RANDHAWA & SCHAAD (1985) desenvolveram uma câmara de bioensaio para seleção de bactérias e outros microrganismos antagonistas baseada na competitividade com o patógeno para colonização de raízes. Os resultados indicaram que esta câmara pode ser utilizada na seleção inicial de rizobactérias.

RHODES & LOGAN (1987) para selecionar agentes biocontroladores de podridão mole de batata, causada por *Erwinia carotovora* (Ec), co-inocularam antagonistas e patógeno em discos de batata perfurados em

três pontos. Todos os isolados foram testados também em campo com formulação em pó dos antagonistas. Os resultados demonstraram que houve correlação entre os dados obtidos em laboratório e em campo. O mesmo não ocorreu quando os resultados foram comparados com o tamanho de zona de inibição a *Ec* pelo isolados em meio B de King (KB) ou BDA (Batata-dextrose-ágar).

BEAUCHAMP et alii (1991) propuseram um método para seleção de rizobactérias baseado na utilização de opinas por estas bactérias. Método este, segundo os autores, que permite a seleção das rizobactérias mais eficientes no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, que podem ser correlacionados com a habilidade de catabolizar muitos componentes orgânicos na rizosfera. Esta característica permite uma seleção para uma melhor competência na rizosfera e maior eficiência no biocontrole.

Vários autores afirmam que a relação entre a atividade bacteriana em inibir o patógeno "in vitro" e suprimir a doença causada por este "in vivo" não existe. Os isolados selecionados desta forma nem sempre serão os melhores agentes de biocontrole; dentre os quais poderíamos citar SCHROTH & HANCOCK (1981); WONG & BAKER (1984) e RHODES & LONGAN (1987).

2.3.3. Formulação de agentes para o biocontrole

O controle biológico depende do estabelecimento e manutenção de um limite populacional de bactérias no material cultivado ou no solo. Qualquer alteração ocasionando uma diminuição na viabilidade desta população pode eliminar a possibilidade de controle (SUSLOW, 1982 e XU & GROSS, 1986a). Os fatores edáficos, como temperatura (LOPER et alii, 1985), umidade do solo (BURR et alii, 1978; CAMPBELL & CLOR, 1985 e DUPLER & BAKER, 1984), pH e conteúdo de argila (CAMPBELL & EPHGRAVE, 1983 e ROSENZWEIG & STOTSKY, 1979), influenciam a sobrevivência, o estabelecimento da bactéria e sua interação com o patógeno.

KLOEPFER & SCHROTH (1981a) desenvolveram formulação constituída de uma mistura do isolado com goma natural e talco. SUSLOW E SCHROTH (1982b) testaram vários materiais como preservativos bacterianos e adesivos na peletização de sementes incluindo goma arábica, carboximetilcelulose, éter metil celulose entre outros. Dos materiais testados apenas o éter metil celulose foi efetivo como preservativo bacteriano e não interferiu significativamente na germinação das sementes.

Posteriormente, vários estudos foram realizados a fim de se efetuar a inoculação com a utilização de géis polímeros, tais como goma natural ou

alginato (BASHAN, 1986; FRAVEL et alii, 1985 e MUGNIER & JUNG, 1985).

2.3.4. Fatores bióticos e abióticos relacionados com a eficiência de rizobactérias

Entre as razões para um "comportamento" inconstante das rizobactérias na interação com o patógeno pode-se destacar: a perda da eficiência ecológica, a ausência do patógeno que se deseja atingir e a variação na colonização de raízes pelo agente de biocontrole. A eficiência ecológica é a habilidade de uma bactéria em competir e sobreviver na natureza (SCHROTH et alii, 1984). Muitas características das bactérias, a maioria delas desconhecidas, contribuem para a eficiência ecológica na rizosfera, sendo que a perda de alguma destas características pode reduzir suas habilidades em se estabelecer ou mesmo de funcionar sobre ou próximo às raízes (WELLER, 1988).

Algumas características podem ser perdidas quando a bactéria é cultivada "in vitro" (SCHROTH et alii, 1984). Uma delas, por exemplo, é a presença de exopolissacarídeo (EPS) produzido naturalmente por bactérias. Mutantes deficientes em EPS originam-se espontaneamente "in vitro" e, eventualmente, predominam na cultura; isto se deve ao fato de se multiplicarem

rapidamente. Tais mutantes podem ser menos capazes de sobreviver quando utilizados como agentes do biocontrole (COSTERTON, 1984).

Cultivos repetidos de *Pseudomonas* fluorescentes "in vitro" podem resultar na perda da eficiência no campo, provavelmente devido a alterações celulares, como por exemplo a não-produção de sideróforos (SCHROTH et alii, 1984).

Em relação à ausência do patógeno que se deseja atingir, pode-se dizer que quando as condições ambientais não são favoráveis ao desenvolvimento de doenças, não ocorre resposta positiva à sua introdução. Isto foi demonstrado pelos estudos com RPCP em batata, onde os isolados *P. fluorescens* WC5374, *P. putida* WC5358 e outros, promoveram o crescimento e produção de batata em curta rotação, o mesmo não ocorrendo em longa rotação (GEELS & SCHIPPERS, 1983b e SCHIPPERS et alii, 1987).

O efeito de outros patógenos que não seja o de interesse se apresenta também como um problema. A bactéria pode eliminar somente um patógeno, tornando um outro predominante. Embora o patógeno-alvo tenha sido eliminado, pode-se pensar que o tratamento foi ineficiente (WELLER, 1988).

XU & GROSS (1986b) aplicaram *P. putida* W4F63 em sementes e monitoraram sua população e a de *Ec* nessas mesmas raízes no campo. A população de W4F63 variou entre 10^4 a 10^6 ufc/g de raiz, enquanto que a população de

Ec foi somente 10% da encontrada nas raízes comparando-se com o controle não tratado.

Bull³, citado por WELLER (1988), tratou sementes de trigo com doses crescentes de *P. fluorescens* 2-79 (aproximadamente 0, 10², 10⁴, 10⁶, 10⁸ ufc/semente) e semeou-as em solo natural infestado com o patógeno da podridão do pé. Foi observada uma relação linear direta entre a dose de 2-79 aplicada e a população que se desenvolveu sobre as raízes. Além disso, constatou-se uma relação inversa entre a população de 2-79 nas raízes e o número de lesões observadas. O autor concluiu que a extensão do controle da podridão do pé foi diretamente relacionada com a colonização do sistema radicular.

Segundo LOPER et alii (1984), populações do isolado A1 ou SH 5 de RFCP introduzidas em sistemas radiculares individuais de batata e em plântulas de beterraba açucareira apresentaram variações de 10 a 100 vezes em sua população. Em uma raiz, a população bacteriana introduzida pode variar algumas unidades logarítmicas ao longo de seu eixo (comprimento), sendo que maior número de bactérias ocorre, usualmente, próximo à fonte de inóculo, havendo um decréscimo em direção à extremidade da raiz (BAHME & SCHROTH, 1987; LOPER et alii, 1984; WELLER, 1984).

3 - BULL, C.T. Wheat root colonization by disease-suppressive or nonsuppressive bacteria and effect of population size on severity of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Pulman, 75p (M.S. - Washington State University), 1987.

A população bacteriana das raízes normalmente é determinada a partir de amostras das mesmas (GEELS & SCHIPPERS, 1983a; HOWIE & ECHANDI, 1983; JUHKE et alii, 1987; KLOEPPER, 1983; KLOEPPER et alii, 1980a; SUSLOW & SCHROTH, 1982b; WELLER, 1983 e XU & GROSS, 1986b), embora este tipo de amostragem superestime a população da bactéria introduzida, uma vez que esta apresenta-se logaritmicamente distribuída no sistema radicular de diferentes plantas (BAHME & SCHROTH, 1987 e LOPER et alii, 1984) e em raízes individuais de uma única planta (BAHME & SCHROTH, 1987). Provavelmente, a principal razão para o comportamento inconstante dos agentes de biocontrole seja devido à colonização das raízes, uma vez que ocorre variação de planta para planta e, em uma determinada planta, de raiz para raiz (WELLER, 1988).

Quando são coletadas amostras de um sistema radicular, em que exista uma grande população, obtém-se, em média, um número proporcional de bactérias, dando a impressão de que a colonização se processou de maneira superior à realidade (STANGHELLINI & RASMUSSEN, 1989).

Segundo KLOEPPER et alii (1989), não há dúvida que inóculos bacterianos de RPCP aumentam a produção de várias culturas, mas o comportamento tem sido geralmente inconsistente, devido à complexidade do sistema. Os efeitos bacterianos no crescimento da planta são resultado da múltipla interação entre a bactéria introduzida, as culturas associadas e a microbiota do solo. Cada um desses

fatores é determinado por diversas variáveis ambientais como o tipo de solo, nutrição, umidade e temperatura.

Um outro ponto importante que deve ser levado em consideração são os fatores abióticos, que podem influenciar nos mecanismos de biocontrole, apesar do fato de poucas evidências diretas de como fatores específicos (como pH, temperatura, umidade, textura e mineralogia do solo, constituintes orgânicos e inorgânicos e pesticidas) possam afetar essas interações entre os fitopatógenos e seus antagonistas no solo (BURPEE, 1990).

2.4. Proteção biológica de órgãos de propagação de plantas

O controle biológico, promovido através da inoculação de bactérias antagonistas em sementes ou outras partes das plantas, envolve o estabelecimento destas no local da possível infecção, inibindo o microrganismo patogênico, proporcionando, desta forma, a proteção biológica do hospedeiro (COOK & BAKER, 1983).

A aplicação direta de microrganismos nas sementes de plantas oferece uma vantagem competitiva sobre os patógenos, que deverão competir pelos mesmos sítios ecológicos antes de ocorrer a infecção (SCHROTH & HANCOCK, 1982).

A maioria dos patógenos que infectam as raízes está em desvantagem, pois se encontra no solo como propágulos dormentes. Sendo assim, a colonização e a infecção podem ocorrer somente se precedidas pela ativação do propágulo, que se dá geralmente através da exsudação de nutrientes pelas raízes em crescimento (NELSON, 1990). Portanto, os patógenos competem com os microrganismos introduzidos que previamente colonizaram a superfície da raiz e também com a microbiota presente que foi simultaneamente ativada por estes exsudados (SCHROTH & HANCOCK, 1982).

A inoculação de sementes com um protetor biológico é de grande interesse para o controle de patógenos de plantas, porque pode proporcionar uma linha de frente de defesa para as raízes (WELLER, 1988).

Microrganismos benéficos, fortes competidores para um ou mais nutrientes na superfície da raiz, bem como bons colonizadores e inibidores de patógenos pela produção de antibióticos ou outros metabólitos, podem proporcionar uma melhor e mais consistente proteção das raízes e, conseqüentemente, um maior crescimento de plantas (COOK & BAKER, 1983).

Entre os protetores biológicos inoculados em sementes, os mais estudados são as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. fluorescentes. As bactérias fluorescentes, principalmente *P. putida* e *P. fluorescens*, apresentam características importantes para utilização no controle

biológico como: possuem o solo como habitat natural; são nutricionalmente versáteis; possuem alta taxa de crescimento; produzem uma grande variedade de antibióticos e sideróforos; controlam naturalmente outros organismos e podem ser introduzidas com sucesso no sistema radicular (WELLER, 1983).

Populações indígenas de RFPF variam de $1,9 \times 10^2$ a $5,6 \times 10^5$ ufc/cm de raiz em diferentes locais (KLOPPER et alii, 1980a). Quando uma linhagem é introduzida, a população é capaz de permanecer em concentrações que variam de 10^3 a 10^6 ufc/cm de raiz, durante todo o período da cultura (GEELS & SCHIPPER, 1983b; XU & GROSS, 1986b).

2.5. Mecanismos de biocontrole

A rizosfera é um excelente lugar para se encontrar bactérias competentes para a colonização e com potencial no biocontrole de patógenos de raízes de plantas. Os agentes biocontroladores eficientes inibem patógenos menores e maiores, reduzindo a incidência de doenças (CHET et alii, 1990).

Os agentes biocontroladores antagonizam patógenos através de mecanismos como competição, antibiose, parasitismo e predação, podendo usar mais de um mecanismo

ao mesmo tempo. Geralmente, são utilizados os mecanismos de competição e antibiose (FRAVEL, 1988).

2.5.1. Competição

Os microrganismos competem uns com outros por alimentos e elementos essenciais no solo e na rizosfera (CHET et alii, 1990). Esta competição entre a rizobactéria e o patógeno pode resultar em substituição ou exclusão deste último (WELLER, 1988).

KLOEPPER et alii (1980b) foram os primeiros a demonstrar a importância da competição por ferro, devida à produção de sideróforos por alguns microrganismos no mecanismo de controle biológico. Segundo LEONG (1986), os sideróforos são agentes transportadores de Fe^{3+} de baixo peso molecular (500-1000 daltons) produzidos por alguns microrganismos em condições limitadas de ferro. Os sideróforos possuem alta afinidade com Fe^{3+} , privando os patógenos deste elemento e inibindo, desta forma, o seu crescimento.

Foi demonstrado "in vitro" por KLOEPPER et alii (1980b) que alguns isolados bacterianos possuíam uma atividade bacteriostática a *Erwinia carotovora* (Ec), causadora de podridão mole em batata, através da produção de sideróforos (pigmentos verde-amarelo fluorescentes) em

meio de cultura com limitação de ferro. O mesmo antagonismo não ocorreu em meio suplementado com 1 microM de FeCl_3 .

Em ensaios realizados pelos mesmos autores em casa-de-vegetação, suplementando-se solo com Fe^{3+} , na forma de etilenodiamina tetracetato de ferro III (Fe EDTA), não foi observado nenhum incremento no crescimento de plantas, embora os isolados benéficos tenham colonizado normalmente as raízes de batata. Estudaram também o sideróforo purificado da linhagem de *P. fluorescens* B-10 chamado de *pseudobactin*, e um sideróforo complexado com ferro, *pseudobactin* férrico. O *pseudobactin* exibiu atividade bacteriostática a *Ec* "in vitro", o mesmo não ocorrendo com o *pseudobactin* férrico.

O efeito do *pseudobactin* sobre o crescimento de plantas de batata e colonização do rizoplane por fungos foi determinado em casa-de-vegetação. Tanto o isolado B-10 como uma suspensão de células, quanto 10 microM de *pseudobactin*, causaram aumentos significativos no crescimento de plantas, quando comparados ao controle tratado com água. O *pseudobactin* férrico a 50 microM, e o isolado B-10 acrescido com 50 microM de Fe EDTA não aumentaram o crescimento das plantas. Observou-se ainda que a população de fungos no rizoplane foi reduzida significativamente nas plantas tratadas com o isolado B-10 em menos 59% e no tratamento com *pseudobactin* em menos 74%, em relação ao controle tratado com água. Os autores concluíram que RPPC aumentam o crescimento de plantas pela

produção de sideróforos, os quais sequestram o Fe^{3+} da rizosfera, tornando-o indisponível a certos microrganismos rizosféricos, que poderiam ser deletérios às plantas.

KLOEPPER & SCHROTH (1981c) testaram linhagens mutantes de *Pseudomonas* spp. fluorescentes que não apresentaram antibiose "in vitro" contra *Ec*, como observado na linhagem selvagem. Os mutantes não fluorescentes e marcados com resistência a ácido nalidixico e rifampicina (100 ug/ml) foram inoculados em batata-semente. Embora a taxa de colonização tenha sido semelhante a do selvagem, o mutante não promoveu crescimento das plantas e não reduziu o número de fungos e bactérias da rizosfera, como ocorreu com o tipo selvagem, que reduziu em até 54% a população de fungos e em até 93% as bactérias gram-positivas.

Já XU & GROSS (1986a) testaram o efeito da concentração de ferro na inibição de *Ec*. A produção de sideróforos pelas linhagens de *P. putida* e *P. fluorescens*, foi completamente reprimida quando adicionaram-se ao meio 100 μM ou mais de FeCl_3 . A inibição de *Ec* pelas linhagens deixou de ocorrer com 10 μM de ferro adicionado ao meio.

BAKKER et alii (1986) estudaram o papel dos sideróforos na produção de batatas em curta rotação através da utilização de mutantes negativos para a produção de sideróforos do isolado de *P. putida* WCS358. Observaram que, quando as batatas-semente foram tratadas com o tipo

selvagem, ocorreu um aumento na produção de até 13%, 86 dias após o plantio. O mesmo não se verificou quando tratadas com o mutante transposon Tn5 sideróforo negativo, que não causou nenhum efeito na produção dos tubérculos.

Os controles de outros patógenos causadores de doenças, como podridão do pé, murcha de *Fusarium* e "damping-off", também têm sido estudados, através da inoculação de sementes com rizobactérias (WELLER & COOK, 1983; WELLER et alii, 1985; ELAD & CHET, 1987; LEBEN et alii, 1987 e LOPER, 1988), demonstrando suas grandes potencialidades.

Os patógenos são sensíveis à ação de sideróforos produzidos pelos antagonistas, em virtude de não os produzirem, ou produzirem com menor afinidade pelo ferro. Outros fatores são os patógenos serem incapazes de usar os sideróforos dos antagonistas ou de outros microrganismos e também o fato de produzirem sideróforos que podem ser utilizados pelos antagonistas (BUYER & LEONG, 1986; LEONG, 1986; MAGAZIN et alii, 1986; SCHER & BAKER, 1982 e SCHROTH & HANCOCK, 1982).

2.5.2. Antibiose

A antibiose é realizada por metabólitos específicos ou não específicos de origem microbiana através de agentes líticos, enzimas, componentes voláteis ou outras

substâncias tóxicas (Jackson⁴, 1965 citado por FRAVEL, 1988).

Segundo FRAVEL (1988), os antibióticos são componentes orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos. Entre os mecanismos de inibição de patógenos, a antibiose é a mais difícil de ser verificada, devido à falta de métodos para se avaliar a produção e a função dos componentes mediadores no solo.

As técnicas genéticas microbianas modernas têm auxiliado nos trabalhos recentes, onde mutantes negativos para produção de antibióticos têm sido empregados na comparação com as linhagens selvagens, facilitando a interpretação dos dados obtidos (HOWIE & SUSLOW, 1986 e TOMASHOW & WELLER, 1988).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são as mais estudadas, pois produzem uma grande variedade de antibióticos ou outros metabólitos secundários (LEISINGER & MARGRAFF, 1979), os quais podem exibir atividades antibiótica e/ou fitotóxica.

O papel destes e outros metabólitos secundários na fisiologia e ecologia desses microrganismos ainda é desconhecido (SCHROTH E HANCOCK, 1982), embora

4 - JACKSON, R. M. Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms. In Ecology of soil-borne plant pathogens, ed. K. F. Baker, W. C. Snyder, pp. 363-369. Berkeley: University of California Press 571 ps.

sabe-se que a pirrolnitrina inibe o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria sp.* e *Verticillium dahliae* (HOWELL & STIPANOVIC, 1979); o "pyoluterin" inibe *Pythium spp.* (HOWELL & STIPANOVIC, 1980); a fenezina inibe *Gaeumannomyces graminis pv. tritici* (TOMASHOW & WELLER, 1988); o composto Afu inibe *Pythium ultimum* (GUTTERSON et alii, 1988).

COLYER & MOUNT (1984) estudaram o comportamento de mutantes antibióticos negativos M74 da linhagem *P. putida* antagonista a *Erwinia spp.* em relação à linhagem selvagem. Observaram que a colonização do rizoplane de plantas foi semelhante para ambos, mutante M74 e linhagem selvagem (10^5 UFC/g, 1 mês mais tarde). Também constatarem em tubérculos produzidos pelo tratamento da batata-semente com o mutante antibiótico negativo M74 uma redução intermediária na severidade da podridão mole. Sugeriram que a antibiose pudesse ter sido responsável pela inabilidade da bactéria antibiótica-negativa na supressão da doença, embora não tivesse sido estabelecida a produção do antibiótico no solo.

2.6. Proteção biológica contra *Erwinia carotovora*

As espécies do gênero *Erwinia* que causam podridão mole no Brasil são: *Ec pv. carotovora* Jones (Ecc), *Ec pv. atroseptica* Hellmers & Dowson (Eca) e *E.*

chrysanthemy Burk et al (Ech) (ROBBS, 1981 e TAKATSU, 1983). Estas ocorrem em várias espécies de plantas hospedeiras, tanto na fase de crescimento da cultura quanto durante o armazenamento, transporte e comercialização dos produtos colhidos. As perdas variam bastante, sendo influenciadas pelas condições climáticas (temperatura e umidade), espécie e/ou subespécie da bactéria envolvida, potencial do inóculo, condições de cultivo e de pós-colheita. As culturas da batata, do tomate, do pimentão, da cenoura e de hortaliças folhosas estão entre as mais atacadas no Brasil (ROBBS, 1980; GALLI et alii, 1980; ROBBS, 1981 e TAKATSU, 1983).

As enzimas extracelulares (pectinases, celulasas, hemicelulasas e proteases) produzidas pelas *Erwinias* spp. atacam os componentes da parede celular e da membrana celular de plantas (GEORGE et alii, 1991), ocasionando os sintomas típicos das doenças. Geralmente causam podridão mole, canela preta, não-emergência de batatas-sementes, podridão de talos e murcha (DHANVANTARI & DIRKS, 1987; PEROMBELON, 1987; POWELSON, 1985; SERFONTEIN et alii, 1991).

O inóculo primário pode ser originado de batata-semente contaminada, do solo infestado ou da água de irrigação (POWELSON & APPLE, 1984; CAPPAERT et alii, 1988 e De BOER et alii, 1978).

Uma outra forma importante de contaminação com bactérias causadoras de podridão mole é devida à

manipulação e operação pós-colheita para a comercialização do produto. Neste processo, geralmente, os produtos são submersos em água. Pode, então, ocorrer a infiltração de *Ec* ou outros patógenos ali presentes nos tecidos feridos ou nas aberturas naturais (BARTZ, 1991).

Para o controle de *Ec* muitos métodos têm sido utilizados, como aplicação de bactericidas, pasteurização de tubérculos, utilização de variedades resistentes e introdução de microrganismos antagonistas. Todavia, nenhum destes tem sido satisfatoriamente efetivo na aplicação a nível comercial (GANS, 1991).

BURR et alii (1978) e KLOEPPER et alii (1980b) obtiveram um aumento significativo de 10 a 15% na produção de batatas pelo tratamento de batatas-sementes com linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida* isoladas da superfície de tubérculos, raízes de batata e aipo. O aumento na produção foi atribuído ao controle da canela preta e podridão mole da batata, causada por *E. carotovora* pv. *carotovora*. Posteriormente, SUSLOW & SCHROTH (1982b) obtiveram respostas semelhantes em beterraba açucareira.

KLOEPPER (1983) aplicou RPCP em batatas-sementes e obteve uma redução significativa de 95-100% a menos na população de *Ec* em raízes de batata quando comparadas ao controle não tratado. Observou ainda um redução na porcentagem de tubérculos filhos infestados com *Ec* de 28 a 92% a menos comparados ao controle. O autor

concluiu que a RPCF pode ser usada no controle de doenças causadas por *Ec* em batata.

JÁ COLYER & MOUNT (1984) verificaram a influência de tratamentos na batata-semente antes e depois da colheita por um isolado de *P. putida* no desenvolvimento da podridão mole. O resultado obtido foi uma redução no tecido apodrecido de 50% em tratamentos antes do plantio e 75% nos tratamentos pós-colheita.

Em testes de campo, RHODES & LOGAN (1986 e 1987) testaram o efeito da inoculação em batata-semente com formulação em pó de duas linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na doença canela preta, causada por *Ec*. Obtiveram um aumento na porcentagem de emergência de batatas-semente, reduções na contaminação, no desenvolvimento de podridão mole, na progênie de tubérculos filhos, no número de talos afetados por canela preta e, conseqüentemente, um aumento na produção de batatas.

Na mesma linha de pesquisa, XU & GROSS (1986b) avaliaram em campo a interação entre a linhagem W4p 63 de *P. putida* e *Ec* na produção de batatas. Observaram uma diminuição na população de *Ec* de até 25% e um aumento de produção de até 11,7% quando comparado ao controle, demonstrando o potencial deste isolado na supressão de *Ec* nos tubérculos.

2.7. Colonização de raízes

KLOEPPER et alii (1989) definiram a colonização de raízes como um processo através do qual uma bactéria sobrevive à inoculação em sementes, multiplica-se na esfermosfera em resposta aos seus exsudados, transfere-se posteriormente ao sistema de raízes em desenvolvimento e, finalmente, aí se multiplica.

LOPER et alii (1984) demonstraram que uma população introduzida de *Pseudomonas* spp. teve uma distribuição log-normal ao longo das raízes de plantas de diversas culturas.

Estudos de microscopia direta do rizoplane mostram que as colônias bacterianas ficam agregadas e ocupam 7-15% da área de superfície da raiz (BENNETT & LYNCH, 1981 e ROVIRA et alii, 1974).

O sucesso no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento de plantas pela introdução de bactérias específicas depende grandemente do estabelecimento e persistência destas bactérias durante o ciclo da cultura nos sítios onde patógenos e MDR podem tornar-se ativos. Esta persistência torna-se difícil em culturas agrícolas porque geralmente os ciclos são longos. Além disto, difícil também é a distribuição uniforme das bactérias nos solos agrícolas (SCHIPPER et alii, 1987).

A principal forma utilizada para introdução de rizobactérias no sistema radicular tem sido através de

sua aplicação em órgãos de propagação de plantas, esperando-se que ocorra a colonização após o desenvolvimento deste sistema (WELLER, 1988).

Algumas rizobactérias introduzidas através da "bacterização" de sementes têm sido detectadas na rizosfera durante todo o período da cultura, embora seu número relativo gradualmente diminua (BOWEN & ROVIRA, 1976).

A determinação da colonização de raízes pelas rizobactérias tem sido realizada através do plaqueamento. As aliquotas de diluições em séries das suspensões de amostras de raízes são feitas em meio seletivo (meio KB com antibióticos) para posterior contagem (BAHME & SCHROTH, 1987; BAHME et alii, 1988; CHAO et alii, 1986 e LOPER et alii, 1984).

Outros métodos têm sido sugeridos para obter informações sobre a distribuição espacial natural das rizobactérias no sistema radicular, pois no método de diluição isto não é possível. STANGHELLINI & RASMUSSEN (1989) propuseram a técnica de impressão de um pedaço de raiz sobre o meio de cultura, rolando-o várias vezes e, desta forma, possibilitando a verificação da distribuição das mesmas na rizosfera.

FRAVEL et alii (1990) desenvolveram um método para detectar, através da bioluminescência, a localização e a quantidade das bactérias introduzidas no solo. No teste foi utilizada *Enterobacter cloacae* linhagem

E6, com plasmídeo pUCD607, introduzido por conjugação e responsável pela bioluminescência. A localização de E6 (pUCD607) na rizosfera de alface foi prontamente determinada pela impressão das raízes em meio agar e detectada por autofotografia.

2.7.1. Processo de colonização de raízes

HOWIE et alii (1987) dividiram hipoteticamente o processo de colonização em duas fases. Na fase I a bactéria adere à raiz e, desta forma, é transportada passivamente pelo alongamento da extremidade da mesma, explicando o decréscimo progressivo da população bacteriana com o distanciamento da semente.

A fase I inicia-se com o primeiro contato da bactéria inoculada na semente com as raízes que estão emergindo. Durante o alongamento destas raízes, algumas bactérias são levadas por suas extremidades, enquanto outras são deixadas nas porções velhas das raízes (WELLER, 1984).

Na fase II, com a bactéria se multiplicando, a população aumenta e se distribui até o limite do seu nicho, em competição com microrganismos nativos. A fase II pode ocorrer concomitantemente com a fase I, porém esta continua após o término da primeira (HOWIE et alii, 1987).

O transporte de bactérias pela extremidade das raízes é, algumas vezes, ineficiente e as extremidades nem sempre se tornam ou permanecem colonizadas. A ausência de bactérias nas extremidades também pode ocorrer por remoção física ou através da competição com bactérias indígenas (BAHME & SCHROTH, 1987). As bactérias com competência rizosférica multiplicam-se e sobrevivem na raiz, o que não ocorre com as que não apresentam esta característica (WELLER, 1988).

O problema também pode ser devido à inabilidade da bactéria em se multiplicar com velocidade compatível com o crescimento da raiz, a qual se estende rapidamente pelo solo (1-9 cm/dia) (FOSTER, 1986).

LIFSHITZ et alii (1986) estudaram a colonização de raízes de amendoim por *E. subtilis*. Observaram que a população diminuía com a distância a partir da origem do inóculo, e que as raízes laterais foram pobremente colonizadas.

2.7.2. Fatores que afetam a colonização

O processo de colonização compreende vários passos: migração na direção das raízes das plantas; aderência; distribuição ao longo da raiz e crescimento (LAM et alii, 1990).

O quimiotactismo tem sido considerado um fator importante na associação entre plantas e bactérias.

AGUILAR et alii (1988), LOAKE et alii (1988) e SCHER et alii (1985) mostraram que linhagens de *Pseudomonas* spp. migram ativamente em direção a sementes de soja no solo, atraídas por substâncias liberadas pelas mesmas. Os autores sugeriram que esse evento pode ser o primeiro passo para o estabelecimento da colonização bacteriana de sementes e raízes. Nenhuma outra correlação foi observada entre a habilidade quimiotáctica e a colonização de raízes em outros experimentos (SCHER et alii, 1988). Na maioria dos casos, a bactéria é introduzida diretamente por inoculação da semente suprimindo a necessidade de quimiotactismo (SCHER et alii, 1988).

JAMES et alii (1985) observaram que existe uma dependência entre a aderência e a concentração bacteriana aplicada. Concluíram que, como vários isolados de diferentes origens aderiram rapidamente às raízes, não houve reconhecimento específico para esta aderência. Também observaram que na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} houve um maior estímulo na ligação entre *Pseudomonas fluorescens* e raízes de plantas de rabanete.

Uma linhagem de *P. putida*, colonizadora da raiz, foi encontrada aglutinada a um complexo glicoproteico presente em raízes lavadas de feijão e pepino (ANDERSON et alii, 1988 e TARI & ANDERSON, 1988).

TARI & ANDERSON (1988) estudaram a colonização de mutantes Agg⁻ (não aglutináveis) comparados com o tipo selvagem. Constataram que os mutantes aderiram às raízes em níveis menores, colonizaram menos extensivamente o sistema radicular e, além disso, a proteção das plantas de pepino a *Fusarium oxysporum* foi menor.

Em outro estudo, exsudados de raiz de ervilha aglutinaram uma alta porcentagem de isolados bacterianos na rizosfera desta planta, quando comparados com isolados não rizosféricos (CHAO et alii, 1986). Dois isolados positivos para aglutinação, quando inoculados em sementes, puderam ser recuperados na rizosfera (7 cm abaixo da semente). Uma linhagem negativa (Agg⁻) não pôde ser recuperada da rizosfera 3 cm abaixo da semente. Esses dados demonstram que a interação molecular da superfície da célula, entre a bactéria e a célula da planta hospedeira, pode ter um importante papel na ligação e na eventual colonização da raiz hospedeira.

LOPER et alii (1985) correlacionaram a osmotolerância "in vitro" com a habilidade das linhagens para o estabelecimento de uma relação estável na rizosfera de batatas. Sabe-se que, em condições de baixa umidade, a tolerância ao solo seco e baixo potencial osmótico podem ajudar a sobrevivência de algumas bactérias na rizosfera (SCHER et alii, 1988).

Em relação à importância da motilidade na colonização, HOWIE et alii (1987) e SCHER et alii (1988) constataram que mutantes não-móveis colonizam as raízes de forma semelhante às linhagens selvagens. Concluíram que a motilidade não é requerida neste processo. Já DE WEGER et alii (1987) observaram que um mutante não-móvel foi prejudicado na habilidade de colonizar as partes inferiores das raízes de batata, quando comparado com a linhagem selvagem.

Esses achados conflitantes sobre o papel dos flagelos podem ser atribuídos a possíveis diferenças nos isolados, na espécie da planta, nas condições físicas do solo e, particularmente, na umidade do solo (LAM et alii, 1990). Outros fatores não inerentes à bactéria podem facilitar ou não a colonização de raízes. Entre eles, pode ser mencionado o potencial matricial, embora a bactéria introduzida possa se difundir do material semeado para as raízes em uma larga faixa de potencial matricial (WELLER, 1988).

HOWIE et alii (1987) observaram que as maiores populações ocorreram em pressões na faixa de $-0,3$ a $-0,7$ bar, na qual, segundo os autores, a disponibilidade de oxigênio e o potencial de turgor das células e/ou a disponibilidade de nutrientes seriam adequadas para o desenvolvimento de células bacterianas. A área de percolação pode servir também para estender a população

bacteriana introduzida na direção das extremidades das raízes (BAHNE & SCHROTH, 1987).

O pH e a temperatura são fatores importantes na colonização. Para o crescimento bacteriano de linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida*, a temperatura e pH ideais "in vitro" seriam de 25-30 °C e o pH de neutro a alcalino. No solo, no entanto, a colonização é favorecida na temperatura de 12 a 18 °C e em pH 6,0 - 6,5. Isso ocorre porque temperatura e pH abaixo do ideal refletem na menor competição com a microbiota indígena (WELLER, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de execução

O trabalho foi desenvolvido no laboratório e casa-de-vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

3.2. Substrato

Nos experimentos IV, V e VI foi utilizado o Latossolo vermelho amarelo "Paredão Vermelho", de textura média, misturado com esterco de curral areia de rio, na proporção de 3:1:1. A mistura no experimento V foi autoclavada por 2 horas a 121 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Análise química da amostra da mistura do solo Latossolo vermelho amarelo "Paredão Vermelho", areia de rio e esterco de boi, nas proporções 3:1:1. Piracicaba, SP.

AMOS P.	M.O.	pH	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al ³⁺	S	T
V%								
TRA	res.	%	CaCl ₂					
nº	ug/cm ³			miliequivalentes/100 g cm ³				
4838	226	3,4	5,5	3,25	3,33	2,39	2,08	9,0
81,8								11,0

3.3. Isolamento de rizobactérias

Para o isolamento, sementes de cenoura cultivar Brasília foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 500g, contendo amostras de solos coletados em várias regiões de São Paulo e de outros Estados, conforme se segue (tabela 2).

Tabela 2. Origem dos isolados utilizados nos experimentos

ISOLADOS	ORIGEM	CULTURA
RPJ	Ribeirão Preto-SF	jardim doméstico
SJRP	S.J.R.Preto-SF	cenoura
CJB	Campos do Jordão-SF	batata
CJF	Campos do Jordão-SF	plantas ornamentais
SPA	São Paulo-SF	alface
LA	Lavras-MG	alface
MCA	Mogi das Cruzes-SF	alface
MCS	Mogi das Cruzes-SF	salsa
MCE	Mogi das Cruzes-SF	escarola
MCC	Mogi das Cruzes-SF	cenoura
PRT	Cascavel-PR	trigo
PRC	Cascavel-PR	cenoura
PRA	Cascavel-PR	alface
CA	Cotia-SF	alface
CAX	Cotia-SF	alcachofra
PEC	Piracicaba-SF	cenoura
MF	Pouso Alegre-MG	alface
SBAR	Sta.Bárbara D'Oeste-SF	desconhecida
CBCO	Cuiabá-MT	desconhecida
L4	Depto.Genética ESALQ	desconhecida
CBFN	Cuiabá-MT	desconhecida
JAG	Jaguariúna-SF	desconhecida
CHAC	Piracicaba-SF	tomate
I9	Depto.Genética ESALQ	desconhecida
RIO	Depto.Genética ESALQ	desconhecida
1 a 40	Londrina-PR;Jundiaí-SF	desconhecida

Após 60 dias, as raízes foram retiradas cuidadosamente dos vasos e lavadas sob água corrente para remoção do solo aderido.

Amostras de raízes (aproximadamente 1g) foram colocadas em tubos contendo 9 ml de solução salina (0,85%) autoclavada e agitadas por 10 minutos em agitador microssom. Aliquotas de 0,1 ml de uma série de diluições foram plaqueadas em duplicata em meio Nutriente Agar (5 g

peptona/1; 3g extrato de carne/1; 8g NaCl/1; 1g extrato de levedura/1 e 18g de bacto agar/1).

As placas foram incubadas por 48 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e colônias com diferentes características morfológicas foram selecionadas e purificadas.

3.4. Isolado de *Erwinia carotovora*

O isolado de *Erwinia carotovora*, subespécie não determinada, foi obtido da cultura liofilizada nº 1603 (isolado a partir de cultura de batata), gentilmente cedida pelo Instituto Biológico de Campinas - Seção de Bacteriologia Fitopatológica.

3.5. Preservação das bactérias

Os isolados bacterianos puros foram mantidos em tubos de penicilina em dois tipos de meio, Nutriente Agar (NA) e B de King (KING et alii, 1954) sob óleo mineral Nujol esterilizado. Os frascos inoculados foram armazenados sob refrigeração a uma temperatura de 4°C.

3.6. Inoculação das sementes

As sementes de tomate, cultivar Santa Cruz Kada, foram desinfestadas superficialmente com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 2,5% na proporção de 1:5 por 2 minutos.

Para os inóculos de rizobactérias foram utilizadas concentrações de aproximadamente 10^7 ufc/ml, ajustadas com auxílio da escala de Mc Farland. Estas foram obtidas através da suspensão das células bacterianas, crescidas por 24 horas em meio NA, em solução salina NaCl (0,85%) autoclavada por 20 minutos a 121°C .

A inoculação das sementes foi feita pela imersão das mesmas na suspensão bacteriana por 5 minutos sob agitação. As sementes do tratamento controle foram imersas pelo mesmo período em solução salina (0,85%) autoclavada.

3.7. Testes de antagonismo "in vitro"

3.7.1. Experimento I - Produção de antibióticos

A produção de antibiótico foi ensaiada pela distribuição de aliquotas de 5 microlitros da suspensão rizobacteriana (10^7 ufc/ml) em placas, em três pontos

equidistantes, com três repetições, contendo 20 ml de meio batata-dextrose-agar (BDA).

As placas com os meios inoculados com rizobactérias foram incubadas em estufa a 28°C por 48h e, após este período, foram pulverizadas (pulverizador Devilbiss) com uma suspensão de *Ec* de aproximadamente 10⁸ ufc/ml. As zonas de inibição foram medidas após 24 horas.

A avaliação da inibição de *Ec* pelas rizobactérias foi baseada no tamanho do halo formado em centímetros em torno da colônia da rizobactéria. A medida do halo foi feita com régua milimetrada, do centro da colônia da rizobactéria até o ponto de início de crescimento de *Ec*.

O meio BDA foi utilizado neste experimento porque favorece a produção de antibióticos, devido ao fato de ter uma alta concentração de ferro e uma baixa concentração de fosfatos (GROSS, 1985).

3.7.2. Experimento II - Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi ensaiada em meio B de King (KB), da mesma forma descrita no item 3.7.1. Neste experimento, porém, os isolados rizobacterianos foram incubados por 24h antes da pulverização com *Ec* e o halo de inibição, medido após 24h.

No teste foi utilizado o meio KB por possuir uma baixa concentração de ferro, condição esta essencial para a produção de sideróforos (GEELS & SCHIPPERS, 1983a).

3.8. Testes de antagonismo "in vivo"

3.8.1. Experimento III - Avaliação da Severidade de *Erwinia carotovora* em tubérculos de batatas comerciais

Tubérculos de batatas comerciais de tamanho médio foram pesados e superficialmente desinfestados pela imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio (1,5%) por 2 minutos. Após a desinfestação, os tubérculos de batata foram lavados três vezes em água destilada esterilizada e colocados para secar em câmara de fluxo laminar por 30 minutos.

Os tubérculos de batatas desinfestados foram inoculados através de imersão por 15 a 20 minutos na suspensão rizobactérianas, a uma concentração de aproximadamente 10^9 ufc/ml. Para cada tratamento foram feitas três repetições. No tratamento controle a imersão dos tubérculos de batatas foi em solução salina (0,85%) autoclavada pelo mesmo período de tempo.

Os tubérculos de batatas inoculados foram incubados em potes plásticos de 500 ml vedados com tampa

sobre papel jornal esterilizado e umedecido com solução salina.

Após 24 horas de incubação a 22 °C, as tubérculos de batatas foram inoculados com uma suspensão de *Ec* com concentração de aproximadamente 10^9 ufc/ml. A inoculação foi feita através de ferimentos em ambos os lados dos tubérculos de batatas com um bastão de 5 pontas, previamente embebidas na suspensão, atingindo aproximadamente 5 mm de profundidade. As tubérculos de batatas foram novamente incubados por 96 horas. Ao final do quarto dia, as tubérculos de batatas foram retirados da incubação. O tecido apodrecido foi removido sob água corrente, os tubérculos de batatas foram submetidos a uma nova pesagem.

A avaliação da severidade da podridão mole foi baseada no método utilizado por COLYER & MOUNT (1984), modificado, utilizando-se três parâmetros:

a - Porcentagem de perda de peso

Determinada pela mudança de peso da tubérculos de batata antes e depois da inoculação, dividida pelo peso inicial e multiplicada por cem.

b - Porcentagem de perda de peso baseadas no seguinte esquema de notas:

Notas	% de perda de peso
0	zero
0,5	0 - 10
1,0	11 - 20
1,5	21 - 30
2,0	31 - 40
2,5	41 - 50
3,0	51 - 60
3,5	61 - 70
4,0	71 - 80
4,5	81 - 90
5,0	91 - 100

c - Número de lesões que desenvolveram a podridão mole.

3.9. Testes de promoção de crescimento de plantas em casa-de-vegetação

3.9.1. Experimento IV - Solo não autoclavado

Vinte e cinco sementes de tomate, cultivar Santa Cruz Kada, inoculadas com 15 diferentes isolados rizobacterianos, através de imersão na suspensão rizobacteriana por 5 minutos, foram semeadas em vasos plásticos contendo aproximadamente 1 kg da mistura

descrita no item 3.2, com cinco repetições. Três semanas após o plantio foi realizado o desbaste, deixando-se 4 plantas por vaso.

A coleta foi feita 30 dias após a emergência, onde o sistema radicular das plantas foi separado da parte aérea e lavado em água corrente para remoção do solo aderido.

A avaliação da promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias foi baseada no peso seco da parte aérea e raiz, comparando-se com o controle não inoculado.

A parte aérea e o sistema radicular de cada repetição (4 plantas) foram colocados separadamente em sacos de papel em estufa a 65 °C, onde permaneceram até a obtenção de um peso constante. O peso da matéria seca foi determinado em balança analítica.

3.9.2. Experimento V - Solo autoclavado

Este experimento foi conduzido da mesma forma que o experimento IV, diferindo apenas pela mistura ter sido autoclavada a 121 °C por 2 horas.

3.10. Avaliação da capacidade de colonização de raízes pelos mutantes (Rif+ e Anal+)

3.10.1. Preparo das soluções estoques de antibióticos

A solução estoque de Rifampicina (Rifaldin - Lepetit S/A) foi obtida com a solubilização em 3 ml de álcool metílico do conteúdo de uma cápsula (300 mg). A este volume foi adicionada água destilada para obter um total de 30 ml de solução (10 mg/ml).

Quanto à solução estoque do ácido nalidixico (Wintomylon-Winthrop Products), um comprimido de 500 mg foi triturado com auxílio de uma cápsula de porcelana e solubilizado com 5 ml de NaOH 0,1N. Foi adicionada água destilada, completando-se o volume para 50 ml de solução (10 mg/ml). Após o preparo, as soluções estoque foram esterilizadas por filtração em filtros milipore de 0,45 micro (SARTORIUS MEMBRANE FILTER) e conservadas sob refrigeração à temperatura de 4 °C.

3.10.2. Marcação genética dos isolados para resistência a antibióticos

Foram obtidos mutantes naturais duplos resistentes à rifampicina (100 ug/ml) e ao ácido nalidixico (100 ug/ml). Os mutantes foram obtidos através do plaqueamento de 0,1 ml da suspensão rizobacteriana,

concentração superior a 10^7 ufc/ml, para garantir o resultado, em meio KB com 100 ug/ml de rifampicina. Após a incubação por 24-48h a 28°C , os mutantes resistentes a rifampicina foram transferidos para placas contendo meio KB com 100 ug/ml de ácido nalidixico.

As colônias de mutantes com duas marcas foram armazenadas em tubos de penicilina contendo aproximadamente 5 ml de meio KB com 100 ug/ml de ácido nalidixico e rifampicina.

3.10.3. Levantamento da ocorrência natural de resistência aos antibióticos rifampicina e ácido nalidixico

Dez sementes de tomate foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 1 kg, em 3 repetições, contendo a mistura descrita no item 3.2. O desbaste foi feito quando as plantas estavam com 2 a 3 folhas definitivas, deixando-se 3 plantas por vaso.

Três semanas após o plantio das sementes, as plantas foram removidas cuidadosamente. Aproximadamente 1 grama de raízes foram colocadas em 9 ml de solução salina (0,85%) autoclavada e agitadas em Vortex por 1 minuto. Aliquotas de 0,1 ml de uma série de diluições foram plaqueadas em meio KB, contendo 100 ug/ml de ácido nalidixico e de rifampicina. Após a incubação por 24-48 h à temperatura em torno de 28°C , realizou-se a contagem do

número de ufc/ml. Utilizou-se como controle o plaqueamento em meio KB, sem os antibióticos.

3.10.4. Experimento VI - Monitoramento da colonização dos mutantes (Rif⁺, Anal⁺) em raízes de plantas de tomate.

Neste experimento utilizou-se como substrato a mistura descrita no item 3.2, acrescida de vermiculita na proporção 3:1.

Seis sementes previamente inoculadas com a suspensão bacteriana, concentração de aproximadamente 10⁸ ufc/ml, foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 1 kg de substrato em quinze repetições.

A determinação da colonização das raízes pelos 4 mutantes naturais de dupla marca de resistência (Rif⁺ e Anal⁺) foi feita pelo monitoramento das populações no sistema radicular, durante o período de um mês. As coletas foram realizadas na segunda, terceira e quarta semanas após a emergência das sementes.

A população bacteriana inicial foi determinada a partir de uma suspensão onde 30 sementes de tomate recém inoculadas com as rizobactérias foram colocadas em 9 ml de solução salina (0,85%) autoclavada e agitadas em Vortex por 1 minuto. Desta suspensão, 0,1 ml de uma série de diluições de até 10⁻⁷ foram plaqueadas em meio KB contendo os antibióticos (100 micrograma/ml de

rifampicina e ácido nalidixico). As placas com os meios inoculados foram incubadas por 48h a uma temperatura de 28°C e após este período foi feita a contagem das colônias.

Para o monitoramento das populações bacterianas nas raízes, 5 plantas foram cuidadosamente retiradas do solo, suas raízes agitadas para remoção do excesso de solo, pesadas e imersas em 10 vezes (10 ml de solução salina para cada grama de raiz) a quantidade de solução salina (0,85%) autoclavada e homogeneizada com agitador Vortex por 3 minutos. Diluições em série até 10^{-4} foram realizadas e 0,1 ml da suspensão foram plaqueadas em meio KB contendo os antibióticos, três repetições. Após incubação por 48 horas procedeu-se a contagem das colônias rizobacterianas.

3.11. Delineamento experimental e análise estatística

Em todos os experimentos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados experimentais obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos a uma análise de variâncias. O teste realizado foi o de Tukey, a nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimentos I e II - Atividade antagonista das rizobactérias isoladas "in vitro"

Foram isolados 193 bactérias do rizoplane de cenouras com diferentes características morfológicas.

Os resultados obtidos de acordo com a produção do halo de inibição (em cm) a *Ec* em meio RDA (batata-dextrose-água) e em meio KB são apresentados nas tabelas 3 e 4.

Os dados demonstram que houve diferença significativa a nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre vários tratamentos. Na tabela 3 foram listadas as 39 melhores bactérias para produção de antibióticos, com halos de inibição acima de 1 cm e na tabela 4 as 23 bactérias produtoras de sideróforos, com halos de inibição a *Ec* acima de 0,62 cm.

Tabela 3. Efeito do antagonismo por rizobactérias sobre o crescimento de *Ec* em meio RDA, avaliado através do tamanho do halo de inibição.

NUMERO DO TRATAMENTO	RIZO-BACTERIA	HALO (cm)	TUKEY 5%
1	13-1	1,73	a
2	7-1	1,73	a
3	22	1,73	a
4	19-4	1,66	ab
5	13-2	1,66	ab
6	10-0	1,63	abc
7	RIO 11	1,63	abc
8	14-1	1,60	abc
9	5	1,50	abcd
10	13-0	1,50	abcd
11	RIO 10	1,46	abcde
12	12-2	1,46	abcde
13	19-1	1,43	abcdef
14	L4/4	1,43	abcdef
15	L4/1	1,40	abcdefg
16	L4/2	1,33	abcdefgh
17	L4/5	1,33	abcdefgh
18	19-3	1,33	abcdefgh
19	CHAC 2	1,30	abcdefghi
20	CBS	1,30	abcdefghi
21	19-2	1,30	abcdefghi
22	L4-3	1,30	abcdefghi
23	JAG 6	1,30	abcdefghi
24	RIO 9	1,23	abcdefghij
25	1-1	1,20	abcdefghij
26	SBAR 4	1,20	abcdefghij
27	27	1,20	abcdefghij
28	5-1	1,16	abcdefghij
29	7-0	1,16	abcdefghij
30	40-0	1,13	abcdefghij
31	SBAR 1	1,10	abcdefghij
32	MG 14	1,06	bcddefghij
33	JAG 5	1,03	bcddefghij
34	20-3	1,03	bcddefghij
35	CHAC 1	1,03	bcddefghij
36	28-0	1,03	bcddefghij
37	25-5	1,00	cdefghij
38	25-2	1,00	cdefghij
39	12-0	1,00	cdefghij

coeficiente de variacao: 17,3%

Tabela 4. Efeito do antagonismo por rizobactérias sobre o crescimento de *Ec* em meio KB, avaliado através do tamanho do halo de inibição.

NUMERO DO TRATAMENTO	RIZO-BACTERIA	HALO (cm)	TUKEY 5%
1	5-0	1,23	a
2	7-0	1,20	ab
3	12	1,17	abc
4	JAG 11	1,10	abc
5	25-5	1,10	abc
6	JAG 6	1,07	abc
7	14-1	1,07	abc
8	10-4	1,07	abc
9	16-1	1,03	abc
10	SBAR 2	1,00	abc
11	JAG 2	0,97	abc
12	20-3	0,97	abc
13	16-2	0,97	abc
14	CBCO3-4	0,93	abc
15	21-2	0,90	abc
16	10-1	0,87	abc
17	CHAC 1	0,80	abc
18	SBAR 3	0,80	abc
19	20	0,78	abc
20	40-0	0,77	abc
21	CBPN7-1	0,67	bc
22	1-1	0,65	bc
23	JAG 3	0,62	c

coeficiente de variacao: 18,6%

Os resultados gerais obtidos na seleção dos 193 isolados bacterianos para antibiose "in vitro" foram: 71 isolados (ou 37%) foram antagonistas a *Ec* em meio BDA e 23 (12%) em meio KB. Embora apenas 23 isolados tenham

inibido *Ec* "in vitro", 44 isolados produziram substâncias fluorescentes em KB.

A amplitude de variação dos halos de inibição foi de 0,6 cm a 1,7 cm de diâmetro em meio BDA e em meio KB a variação foi de 0,62 a 1,23 cm de diâmetro.

O tipo de inibição pela produção de pigmentos fluorescentes em meio KB foi bacteriostático e não bactericida, porque *Ec* voltou a crescer cinco dias depois, concordando com o observado por XU & GROSS (1986a).

As demais 99 rizobactérias (ou 51% do total) não produziram halo de inibição em nenhum dos tipos de meios utilizados. Também foi observado que as bactérias só foram capazes de produzir sideróforos em meio KB, não os produzindo em meio BDA.

Os testes de antagonismo "in vitro" permitem uma seleção inicial dos isolados, dificilmente realizável em campo ou mesmo em casa-de-vegetação. Isto é devido ao fato de ser necessário um grande número de microrganismos a serem testados para a seleção de poucos que terão potencial para o biocontrole. Segundo SCHROTH & HANCOCK (1981) apenas 2 a 5% das bactérias isoladas do sistema radicular podem vir a produzir algum efeito benéfico sobre plantas como, por exemplo, a promoção do crescimento.

A produção de sideróforos por microrganismos tem sido relacionada ao aumento no crescimento de plantas

pela inibição do desenvolvimento de patógenos (KLOEPFER et alii, 1980b e c).

Os sideróforos são substâncias geralmente fluorescentes produzidas por microrganismos em condições limitadas de ferro (LEONG, 1986). Segundo NEILANDS (1981), o meio KB possui baixa concentração de ferro, condição que favorece a produção de sideróforos. Estas substâncias possuem uma alta afinidade com Fe^{3+} e, assim, quelam este elemento, tornando-o indisponível aos demais microrganismos ali presentes, impedindo assim o crescimento dos mesmos (BUYER & SIKORA, 1990).

Para verificar se a zona de inibição que ocorria em meio KB era devido à competição por Fe^{3+} , KLOEPFER et alii (1980b) e XU & GROSS (1986a) adicionaram $FeCl_3$ ao meio e verificaram que antibiose contra *Ec* não ocorreu. Esses resultados desmonstram qual foi o possível mecanismo da inibição observado neste experimento em meio KB por diversas rizobactérias testadas.

Dentre os 94 isolados bacterianos testados, a maioria (76%) foi produtora de antibióticos em BDA, capazes de inibir em maior proporção, de acordo com o tamanho do halo de inibição, o crescimento de *Ec* "in vitro". Todavia, nenhum destes foi capaz de inibir completamente o crescimento do patógeno como observado GEELS & SCHIPPERS (1983b).

Alguns isolados testados demonstraram capacidade de inibição a *Ec* em ambos os tipos de meio, entre eles os isolados Chac1, 25-5, 7-0, 20-3 e 14-1, concordando com os resultados observados XU & GROSS (1986a).

A supressão de microrganismos deletérios na rizosfera de plantas também tem sido relacionada à produção de antibióticos por microrganismos benéficos. Contudo, esta hipótese tem sido questionada devido à falta de métodos para avaliar a produção e a função dos componentes mediadores nas raízes (FRAVEL, 1988). Além disso, o papel dos metabólitos que causam antibiose na ecologia e fisiologia da microbiota das raízes ainda é desconhecido (SCHROTH & HANCOCK, 1981).

O método mais utilizado para verificar o efeito causado pelos antibióticos na microbiota das raízes é através da aplicação de mutantes defectivos para produção do antibiótico em questão e posterior comparação com o isolado selvagem.

COLYER & MOUNT (1984) verificaram que mutantes defectivos para produção de antibióticos foram menos habilidosos na colonização de raízes de plantas de batatas.

A falta de correlação geralmente encontrada entre os resultados de antagonismo obtidos "in vitro" e no solo (SCHROTH & HANCOCK, 1981 e SUSLOW, 1982) indica que o

antagonismo "in vitro" não deve ser o único critério para a seleção de biocontroladores. RHODES & LOGAN (1987) sugerem que os ensaios "in vitro" são essenciais na elucidação dos mecanismos responsáveis pelo controle biológico.

Embora testes de antagonismo "in vitro" não garantam que ocorrerá o mesmo "in vivo", devido às diferentes condições ambientais que serão encontradas pelo microrganismo, estes testes são fáceis de serem realizados e permitem a obtenção de resultados em curto período de tempo, utilizando-se pouco material e espaço.

4.2. Experimento III - Seleção de antagonistas "in vivo"

Os isolados selecionados "in vitro", foram testados pela inoculação em tubérculos de batatas comerciais para o controle da severidade de *Ec*.

Dos 94 isolados testados no controle de podridão mole em tubérculos comerciais, 41 (44%) diminuíram a severidade da doença, sendo que em 7 (8%) dos isolados, a diminuição foi significativa quando comparados ao controle (Tabelas 5 e 6).

Os resultados finais com os 22 melhores isolados, selecionados previamente conforme descrito no item 3.8.1., são apresentados nas tabelas números 5 e 6 e gráficos 1 e 2.

Como pode ser observado nestas tabelas, houve diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade (teste de Tukey) entre os tratamentos. Entretanto, é importante salientar que todos os 22 isolados dos testes finais diminuíram a severidade da doença, embora o mecanismo deste efeito não tenha sido determinado. Estes resultados demonstram que de alguma forma os isolados bacterianos interferiram no ataque de *Ec* aos tecidos, concordando com os resultados observados COLYER & MOUNT (1984) e RHODES & LOGAN (1986 e 1987) que constataram que rizobactérias podem inibir a podridão mole quando aplicadas diretamente em tubérculos de batata.

Também foi observado que cerca de 10% dos isolados testados aumentaram a porcentagem de perda de peso dos tubérculos pela podridão mole, quando comparados ao controle não tratado, concordando com observações feitas por RHODES & LOGAN (1987).

Tabela 5. Efeito de rizobactérias na porcentagem de perda de peso em tubérculos de batatas comerciais inoculados com *Ec*, após 5 dias de incubação a 22°C.

NUMERO DO TRATAMENTO	RIZO-BACTERIA	MEDIAS % de perda de peso	TUKEY 5%
1	CONTROLE	57,83	abc
2	28-0	57,58	abc
3	12-2	56,90	abc
4	JAG 2	55,89	abc
5	JAG 3	55,31	abcd
6	JAG 6	53,35	abcd
7	24-1	52,47	abcd
8	15-0	51,04	bode
9	19-1	50,13	bcde
10	CHAC 2	49,63	bcde
11	CBPN 7	48,29	bcde
12	CBPN 7-1	47,78	bcde
13	PRC-1	46,12	cde
14	18-3	42,65	de
15	L4/11	38,85	e

coef. variacao: 7,949%

Tabela 6. Efeito de rizobactérias na porcentagem de perda de peso em tubérculos de batatas comerciais inoculados com *Ec*, após 5 dias de incubação a 22°C.

NUMERO DO TRATAMENTO	RIZO-BACTERIA	MEDIAS % de perda de peso	TUKEY 5%
1	CONTROLE	67,69	a
2	20-2	66,76	a
3	CBCO 3	60,96	ab
4	13-1	57,52	ab
5	7-0	50,04	bc
6	L4/1	43,94	cd
7	SBAR 3	38,53	d
8	SBAR 4	34,49	d
9	23	23,17	e

coef. variacao: 8,017%

Gráfico 1. Representação do efeito de rizobactérias na porcentagem de perda de peso em tubérculos de batatas comerciais inoculados com *Ec*, após 5 dias de incubação a 22°C.

Gráfico 2. Representação do efeito de rizobactérias na porcentagem de perda de peso em tubérculos de batatas comerciais inoculados com *Ec*, após 5 dias de incubação a 22°C.

LIAO & WELLS (1987), investigando bactérias causadoras de podridão mole em vários tipos de vegetais, constataram que 50% das bactérias causadoras da doença não pertenciam ao grupo das *Erwinias*. Sendo assim, podemos sugerir que o aumento da severidade da podridão mole por alguns isolados bacterianos, observados nestes testes, deve ter sido ocasionado por um efeito sinérgico entre *Ec* e o isolado aplicado.

As tabelas 7 e 8 mostram os resultados dos diferentes parâmetros empregados na avaliação do desenvolvimento da podridão mole como: a porcentagem de perda de peso, notas atribuídas à quantidade de doença e número de perfurações que desenvolveram a podridão mole.

Como pode ser observado nas tabelas 7 e 8, houve uma diminuição de até 45% na porcentagem de perda de peso entre o melhor tratamento (isolado 23) e o controle.

A utilização de notas para a quantificação da doença (tabelas 9 e 10), em função da porcentagem de perda de peso, foi representativa, havendo diferença significativa a nível de 5% pelo teste de Tukey entre os tratamentos. As bactérias CBPN7, L4/11, 7(0), L4/1, SBAR-3, SBAR-4 e 23 diferiram significativamente em relação ao controle.

Tabela 7. Influência de rizobactérias no controle de *Ec* em tubérculos de batatas comerciais, em três repetições.

RIZO - BACTERIA	PESO INICIAL (g) (media)	PESO FINAL (g) (media)	% PERDA (media)	NOTA (media)	N° DE LESOES DESENVOLVIDAS (media)
CONTROLE	70,98	30,08	57,83	3,17	10,00
18-3	70,04	40,20	42,64	2,50	9,67
SBAR-2	75,20	30,26	59,79	3,17	10,00
CBPN7-1	62,28	32,58	47,79	2,50	10,00
28(0)	70,39	29,69	57,58	3,17	10,00
12-2	71,70	30,79	56,90	3,17	10,00
JAG-6	70,32	32,93	53,35	3,00	10,00
24-1	72,78	34,55	52,47	3,00	9,83
15(0)	76,66	37,60	51,04	2,83	9,83
CHAC-2	77,77	39,17	49,63	2,83	9,67
PRC-1	75,16	40,48	46,12	2,50	9,50
JAG-3	79,78	35,79	55,31	3,00	10,00
19-1	63,82	31,91	50,15	2,67	10,00
L4-2	67,06	23,19	65,12	3,50	10,00
CBPN7	66,22	39,84	39,90	2,33	9,33
L4-11	63,22	38,70	38,85	2,17	9,17
L4-5	65,38	26,25	59,75	3,33	9,83
JAG-2	62,01	27,26	62,01	3,17	10,00

Tabela 8. Influência de rizobactérias no controle de *Ec* em tubérculos de batatas comerciais, em três repetições.

RIZO - BACTERIA	PESO INICIAL(g) (media)	PESO FINAL(g) (media)	% PERDA (media)	NOTA (media)	N° DE LESOES DESENVOLVIDAS (media)
13-1	87,40	37,13	57,52	3,00	10,00
SBAR-3	87,06	53,51	38,53	2,00	9,83
23	85,88	65,89	23,17	1,33	8,67
7(0)	79,33	39,66	50,04	2,67	9,50
SBAR-4	79,10	51,72	34,49	2,00	8,83
20-2	80,61	26,71	66,76	3,50	10,00
CBCO-3	80,38	31,32	60,96	3,17	10,00
L4/1	84,72	47,80	43,94	2,33	9,83
CONTROLE	79,09	25,51	67,69	3,50	10,00

Tabela 9. Análise da representatividade da utilização de notas para a quantificação da doença, em função da porcentagem de perda de peso (Tukey a 5%).

NUMERO DE ORDEM	RIZO- BACTERIA	MEDIAS	TUKEY 5%
1	CONTROLE	3,17	abc
2	28(0)	3,17	abc
3	12-2	3,17	abc
4	JAG-2	3,17	abc
5	JAG-3	3,00	abcd
6	JAG-6	3,00	abcd
7	24-1	3,00	abcd
8	15(0)	2,83	abcde
9	CHAG-2	2,83	abcde
10	19-1	2,67	bcd
12	CBPN7-1	2,50	cde
13	PRC-1	2,50	cde
14	18-3	2,50	cde
15	CBPN-7	2,33	de
16	L4-11	2,17	e

coef. variacao: 6,924%

Tabela 10. Análise da representatividade da utilização de notas para a quantificação da doença, em função da porcentagem de perda de peso (Tukey a 5%).

NUMERO DE ORDEM	RIZO- BACTERIA	MEDIAS	TUKEY 5%
1	CONTROLE	3,50	a
2	20-2	3,50	a
3	CBCO-3	3,17	ab
4	13-1	3,00	abc
5	7(0)	2,67	bc
6	L4-1	2,33	cd
7	SBAR-3	2,00	d
8	SBAR-4	2,00	d
9	23	1,33	e

coef. variacao: 5,511%

A utilização do número de lesões que desenvolveram a doença, como um outro parâmetro, apenas serviu para indicar que em geral todos os ferimentos a desenvolveram. Contudo, a diferença constatada foi somente na profundidade e no diâmetro das lesões, o que sugere que são essas as medidas que devem ser utilizadas como parâmetro na avaliação da severidade da doença.

Os resultados observados demonstram que possivelmente rizobactérias podem proteger tubérculos contra origens exógenas de *Ec*, mesmo quando inoculadas por um método drástico como através de ferimentos.

Segundo RHODES & LOGAN (1987), testes de inibição de *Ec* no próprio tubérculo, visando a seleção de isolados, são representativos e podem ser correlacionados com dados obtidos em campo, como foi observado pelos autores com a formulação em pó dos isolados.

A técnica de aplicação de rizobactérias em tubérculos comerciais, executada neste experimento, poderia ser de grande utilidade a nível comercial em tratamentos pós-colheita nos produtos suscetíveis a *Ec*. Como muitos destes produtos já vêm infectados do campo, e durante o armazenamento, se as condições são favoráveis à doença, podem ocorrer grandes perdas. Com esta técnica, perdas maiores poderiam ser evitadas em produtos já infectados em campo e armazenados sob condições que poderiam ser favoráveis ao ataque da bactéria.

COLYER & MOUNT (1984) observaram uma redução de até 79% no tecido apodrecido, causado por *Ec*, em tratamentos pós-colheita quando inocularam um isolado de *Pseudomonas putida* em batatas-sementes

4.3. Experimentos IV e V - Seleção de isolados promotores de crescimento em casa-de-vegetação

Nos experimentos IV e V, foram testadas 41 bactérias, selecionadas como descrito no item 3.9, para a promoção de crescimento de plantas de tomate em casa-de-vegetação, utilizando-se solos autoclavado e não-autoclavado.

Nos resultados apresentados na tabelas 11 e 12, com os 15 melhores isolados, pode-se observar que houve diferença significativa a nível de 5% de probabilidade (teste de Tukey) entre os pesos secos médios da parte aérea e raiz dos diversos tratamentos.

As 15 bactérias testadas apresentaram bons resultados em testes preliminares e nestes últimos testes todas foram capazes de promover o crescimento de plantas de tomate, tanto em solo autoclavado como não autoclavado (tabelas 13 e 14).

Em solo autoclavado (tabela 13), o peso seco das raízes variou de -1% (para o isolado 23) a 119% (para o

isolado 7(0)) e o peso da parte aérea variou de 39% (isolado SBAR-4) a 139% (isolado L4/11).

Como pode ser observado na tabela 14, a variação na porcentagem de aumento de crescimento (peso seco) da parte aérea em solo não autoclavado foi de 8% (para o isolado L4/2) a 44% (para o isolado 23). Em relação ao crescimento das raízes, também houve variação de -9% (para o isolado CBCO3) a 37% (para o isolado L4/2). Pode-se ainda observar que dois isolados, 20-2 e CBCO-3, causaram uma diminuição no crescimento das raízes em relação ao controle, respectivamente -1% e -9%.

Tabela 11. Resultados da análise estatística (teste de Tukey a 5% de significância) do efeito no crescimento de plantas de tomate (peso seco em g das partes aérea e raiz) causado pela inoculação de sementes com rizobactérias em solo não-autoclavado.

RIZO - BACTERIA	MEDIAS (g) PARTE AEREA	TUKEY 5%	RIZO - BACTERIA	MEDIAS (g) PARTE RAIZ	TUKEY 5%
23	4,64	a	L4-2	0,95	a
SBAR-3	4,37	ab	23	0,90	ab
L4-11	4,28	ab	24-1	0,83	abc
24-1	4,26	ab	L4-1	0,83	abc
L4-1	4,18	ab	CHAC-2	0,81	abc
20-2	4,15	ab	13-1	0,78	abc
SBAR-4	4,08	ab	15(0)	0,76	abc
13-1	3,97	ab	L4-11	0,75	abc
7(0)	3,92	ab	SBAR-3	0,75	abc
CHAC-2	3,87	ab	SBAR-2	0,74	abc
15(0)	3,81	ab	7(0)	0,72	abc
CBCO-3	3,78	ab	SBAR-4	0,72	abc
9-1	3,69	ab	9-1	0,70	abc
SBAR-2	3,57	ab	CONTROLE	0,69	bc
L4-2	3,47	b	20-2	0,68	bc
CONTROLE	3,22	b	CBCO-3	0,63	c
coef. de variacao = 11,331%			coef. de variacao = 12,881%		

Tabela 12. Resultados da análise estatística (teste de Tukey a 5% de significância) do efeito no crescimento de plantas de tomate (peso seco em g das partes aérea e raiz) causado pela inoculação de sementes com rizobactérias em solo autoclavado.

RIZO - BACTERIA	MEDIAS (g) PARTE AEREA	TUKEY 5%	RIZO - BACTERIA	MEDIAS (g) PARTE RAIZ	TUKEY 5%
L4-11	5,25	a	7(0)	1,26	a
L4-2	4,88	ab	20-2	1,21	ab
L4-1	4,74	ab	13-1	1,05	abc
7(0)	4,60	abc	L4-11	1,00	abc
SBAR-2	4,44	abcd	SBAR-3	0,95	bcd
20-2	4,24	bcd	L4-2	0,95	bcd
CBCO-3	4,19	bcde	SBAR-2	0,92	bcd
15(0)	4,15	bcde	CBCO-3	0,90	cd
13-1	4,10	bcde	L4-1	0,85	cde
SBAR-3	3,96	bcdef	24-1	0,85	cde
24-1	3,73	cdef	SBAR-4	0,85	cde
9-1	3,50	def	15(0)	0,83	cde
23	3,22	ef	9-1	0,70	de
CHAC-2	3,08	fg	CHAC-2	0,70	de
SBAR-4	3,05	fg	CONTROLE	0,58	e
CONTROLE	2,20	g	23	0,57	e
coef. de variacao = 9,891%			coef. de variacao = 12,749%		

Tabela 13. Efeito no crescimento de plantas de tomate em solo autoclavado (peso seco em g), causado pela inoculação de sementes com rizobactérias, em casa-de-vegetação.

RIZO - BACTERIA	PARTE A/R	MEDIA (g)	% raízes no peso total	aumento % de peso em rel. ao Controle
13-1	A	4,10	20,4%	86,3
	R	1,05		82,2
SBAR-3	A	3,96	19,4%	80,0
	R	0,95		65,7
23	A	3,22	15,1%	46,1
	R	0,57		(0,9)
7(0)	A	4,60	21,5%	109,0
	R	1,26		119,1
SBAR4	A	3,05	21,7%	38,5
	R	0,85		47,0
20-2	A	4,24	22,2%	92,5
	R	1,21		109,6
====(cont.)=====				

====(cont.)=====				
RIZO - BACTERIA	PARTE A/R	MEDIA (g)	% raizes no peso total	aumento % de peso em rel.ao Controle
=====				
CBCO-3	A	4,19	17,7%	90,6
	R	0,90		56,5
SBAR-2	A	4,44	17,1%	101,8
	R	0,92		59,6
15(0)	A	4,15	16,6%	88,8
	R	0,83		43,9
24-1	A	3,73	18,5%	69,4
	R	0,85		47,4
9-1	A	3,50	16,6%	59,2
	R	0,70		21,3
L4/2	A	4,88	16,3%	121,8
	R	0,95		64,8
CHAC-2	A	3,08	18,5%	39,8
	R	0,70		21,3
L4/1	A	4,74	15,2%	115,3
	R	0,85		47,8
L4/11	A	5,25	16,0%	138,5
	R	1,00		73,9
CONTROLE	A	2,20	20,7%	0,0
	R	0,58		0,0
=====				

Tabela 14. Efeito no crescimento de plantas de tomate em solo não-autoclavado (peso seco em g), causado pela inoculação de sementes com rizobactérias, em casa-de-vegetação.

RIZO - BACTERIA	PARTE A/R	MEDIA (g)	% raizes no peso total	aumento % de peso em rel.ao Controle
13-1	A	3,97	16,3%	23,1
	R	0,78		11,9
SBAR-3	A	4,37	14,6%	35,5
	R	0,75		7,9
23	A	4,64	16,2%	44,1
	R	0,90		30,0
7(0)	A	3,92	15,6%	21,5
	R	0,72		4,3
SBAR-4	A	4,08	15,0%	26,5
	R	0,72		3,6
20-2	A	4,15	14,1%	28,6
	R	0,68		(1,4)
====(cont.)=====				

=====(cont.)=====				
RIZO - BACTERIA	PARTE A/R	MEDIA (g)	% raizes no peso total	aumento % de peso em rel.ao Controle
=====				
CBCO-3	A	3,78	14,3%	17,2
	R	0,63		(9,0)
SBAR-2	A	3,57	17,1%	10,7
	R	0,74		6,1
15(0)	A	3,81	16,6%	18,2
	R	0,76		9,4
24-1	A	4,26	16,3%	32,2
	R	0,83		19,9
9-1	A	3,69	16,0%	14,6
	R	0,70		1,4
L4-2	A	3,47	21,5%	7,6
	R	0,95		36,8
CHAC-2	A	3,87	17,3%	19,9
	R	0,81		16,6
L4-1	A	4,18	16,5%	29,6
	R	0,83		19,1
L4-11	A	4,28	14,9%	32,7
	R	0,75		8,3
CONTROLE	A	3,22	17,7%	0,0
	R	0,69		0,0
=====				

As respostas nas plantas de tomate à bacterização, com os diferentes isolados, variaram na razão entre os pesos das partes aérea e de raiz, embora tenha havido pouca correlação entre os valores obtidos, tanto em solo autoclavado ($r=0,66$) como em não autoclavado ($r=0,24$). Esta variação entre as razões de peso seco parte aérea e raiz das plantas também foi observada em plantas de tomate, alface, batata, pepino e girassol por VAN PEER & SCHIPPERS (1988) e FAGES & ARSAC (1991).

Observando-se comparativamente os gráficos 3 e 4, pode-se verificar que, não obrigatoriamente, o tratamento com maior peso seco de parte aérea possui o maior peso seco de raiz.

A média da porcentagem de peso seco das raízes, em relação ao peso seco total das plantas, foi de 17% em solo não autoclavado e de 18% em solo autoclavado (Tabelas 13 e 14).

Como pode ser observado nos gráficos 3 e 4, o crescimento das raízes, em termos de peso seco, não foram consideravelmente diferentes entre si, concordando com o observado por FAGES & ARSAC (1991).

Gráfico 3. Efeito de rizobactérias no crescimento de plantas de tomate (peso seco em g, parte aérea e raiz) em casa-de-vegetação

Gráfico 4. Efeito de rizobactérias no crescimento de plantas de tomate (peso seco em g, parte aérea e raiz) em casa-de-vegetação

O mesmo não ocorreu em relação à parte aérea das plantas.

Pode-se observar ainda pelas tabelas 13 e 14, que, em solo autoclavado, foram obtidos aumentos mais significativos (de até 138% na parte aérea e até 119% nas raízes, relativos ao controle) do que os obtidos em solo não autoclavado (de até 44% na parte aérea e 37% nas raízes, também relativos ao controle).

E importante salientar que os isolados que inibiram efetivamente a perda de peso em tubérculos de batatas comerciais (tabelas 5 e 6), isolados 23, SBAR3, L4/11, L4/1 e SBAR-4, foram os que mais promoveram o crescimento de plantas em casa-de-vegetação (Tabelas 11 e 12) . O mesmo não foi observado "in vitro" em relação ao tamanho do halo de inibição de *Ec*, ocorrendo somente em alguns isolados (13-1, 19-1, Chac2, 7-0 e SBAR4), concordando com o observado por RHODES & LOGAN (1987).

E geralmente aceito que a promoção de crescimento de plantas por rizobactérias benéficas ocorre como resultado da supressão da microbiota deletéria da rizosfera, não sendo observada em solo esterilizado (KLOEPPER & SCHROTH, 1981b e SCHROTH & HANCOCK, 1982), o que discorda dos resultados obtidos neste experimento.

Por outro lado, LIFZHITZ et alii (1987) observaram que alguns isolados de RCPF foram capazes de promover o crescimentos de plantas de colza em solo

esterilizado, ou seja, na ausência de microrganismos deletérios, o que concorda com os dados levantados.

Em processos menos drásticos de desinfestação do solo, BROADBENT et alii (1977) observaram aumentos significativos no peso de plantas de várias espécies quando as sementes foram inoculadas com *Bacillus* spp. e cultivadas em solos tratados com vapor por 30 minutos a 100°C e 60°C, concordando parcialmente com os dados deste trabalho.

Outras alternativas que justificariam a promoção do crescimento de plantas na ausência de microrganismos deletérios seriam a produção, pelos microrganismos introduzidos, de substâncias reguladoras de crescimento como auxinas, giberelinas e citoquininas (BROWN, 1974) e/ou o aumento, favorecido por estas rizobactérias, na disponibilidade de nutrientes como, por exemplo, o fósforo e nitrogênio (LIFSHITZ et alii, 1987; TURNER & BACKMAN, 1991).

4.4. Seleção de mutantes naturais de alguns isolados para resistência a antibióticos e avaliação da ocorrência natural da resistência

A seleção de isolados mutantes naturais para resistência a ácido nalidíxico e rifampicina foi realizada

para o monitoramento de quatro isolados na colonização de raízes de tomateiro. Devido ao complexo ecossistema encontrado nas raízes, isto seria impossível de ser verificado sem essas marcas, que facilitam o reisolamento.

Foram obtidos dos isolados L4/1, 24-1, 23 e SBAR3, mutantes naturais com dupla marca de resistência que apresentaram boas características nos testes anteriores, embora a tentativa na obtenção de mutantes tenha sido feita para vários outros isolados.

Nos isolamentos, realizados em raízes de plantas de tomateiro para verificação da ocorrência natural da resistência a ácido nalidixico e rifampicina (100 microgramas/ml em KB), não foi observado nenhum crescimento bacteriano, apenas ocorrendo o crescimento de alguns fungos. Colônias bacterianas cresceram apenas em meio KB sem os antibióticos. Esses resultados indicam a ausência de mutantes naturais no solo com dupla marca de resistência aos antibióticos utilizados, concordando com o observado por BRANDÃO (1989).

4.5. Experimento VI - Avaliação da capacidade de colonização de mutantes (Rif+ e Anal+)

Entre alguns dos isolados promotores de crescimento de plantas de tomateiro em casa-de-vegetação, quatro mutantes naturais (dos isolados L4/1, 23, SBAR3 e

24-1) com resistência a rifampicina e ácido nalidixico (100 microgramas/ml) foram testados para capacidade de colonização.

Pela tabela 15 e gráfico 5 pode-se verificar que apenas um isolado (SBAR3) foi capaz de permanecer nas raízes um mês após o plantio com uma população de 1.1×10^5 ufc/g de raízes peso fresco, embora tenha ocorrido uma diminuição em relação ao inóculo inicial.

Tabela 15. Monitoramento de isolados rizobacterianos, mutantes resistentes à rifampicina e ácido nalidixico, na rizosfera de plantas de tomate (peso fresco em g) em casa-de-vegetação.

RIZO- BACTERIA	ufc/g de semente	ufc/g de raiz		
	SEMENTE (*)	2a. SEMANA	3a. SEMANA	4a. SEMANA
24-1	26.923.000	220.000	12.000	-
L4-1	43.077.000	400.000	3.000	-
23	2.153.846.000	16.000.000	2.000	-
SBAR-3	2.769.231.000	67.000.000	1.400.000	110.000

Gráfico 5. Curvas de sobrevivência (log-normal) de isolados rizobacterianos, mutantes resistentes a rifampicina e ácido nalidixico, na rizosfera de plantas de tomate (peso fresco em g X tempo em semanas) em casa-de-vegetação.

Concordando com os dados obtidos neste experimento, podem ser relacionados trabalhos de diversos autores. EKLUND & SINDA (1971) observaram que oito semanas após o tratamento de sementes de pepino, rizobactérias que colonizaram com sucesso inicialmente o sistema radicular, dificilmente foram detectadas na rizosfera. KLOEPPER et alii (1980a) observaram que a população de rizobactérias, em plantas de batata, diminuiu drasticamente quatro a seis semanas após a emergência das plantas, permanecendo então estabilizada; a colonização variou de 10^2 a 10^5 ufc/cm de raiz duas semanas após a emergência. GEELS & SCHIPPERS (1983b) e XU & GROSS (1986b) observaram o mesmo para populações de *Pseudomonas* spp. Também LOPER et alii (1984) mostraram uma distribuição log normal na população bacteriana na rizosfera de plantas de batata.

GEELS & SCHIPPERS (1983b) sugeriram que a colonização inicial abundante de raízes dura um período limitado. Também observaram que a população total de bactérias fluorescentes estava em número relativamente elevado, o que poderia indicar que a resistência dos isolados aos antibióticos teria duração limitada. Observaram ainda que, quando a concentração dos antibióticos no meio seletivo era diminuída, um número maior de colônias cresciam nas placas.

A não detecção dos mutantes naturais L4/1, 24-1 e 23, na quarta semana após o plantio, pode indicar que tenha havido algum problema na colonização. Segundo

WELLER (1988), o processo de colonização é bastante complexo, e vários fatores abióticos e bióticos como pH, temperatura, umidade e características da própria bactérias podem neste interferir.

Todavia, a ausência verificada das três bactérias nas raízes das plantas pode não ser devida necessariamente à efetiva ausência da bactéria: a população das mesmas pode estar abaixo dos limites da técnica de detecção empregada. BAHNE & SCHROTH (1987) constataram que populações abaixo de 10^5 ufc/g de solo dificilmente podem ser detectadas, mesmo com a utilização de meios seletivos, e que bactérias produtoras de polissacarídeos extracelulares dificilmente são isoladas, devido à adsorção aos colóides do solo.

GEELS & SCHIPPERS (1983b) sugeriram ainda que membros da população de bactérias resistentes a antibióticos podem reverter espontaneamente esta sensibilidade, quando confrontadas com a pressão seletiva existente na rizosfera. Escapam, desta forma, ao meio contendo os antibióticos, método de detecção geralmente utilizado.

5. CONCLUSÕES

1- Rizobactérias, isoladas do rizoplano de cenoura, possuem habilidade para diminuir a severidade da bactéria *Ec* quando pré-inoculados em tubérculos de batata. A linhagem 23 diminuiu em até 44,52% a porcentagem de perda de peso em batatas inoculadas com o patógeno.

2- Nos testes de colonização do sistema radicular o método de aplicação de mutantes naturais resistentes à rifampicina e ao ácido nalidixico permitiu a observação da persistência de um dos isolados (SBAR-3) nas raízes um mês após a emergência das plantas de tomateiro e o monitoramento da população bacteriana;

3- A promoção do crescimento de plantas (medida em peso seco - g) por rizobactérias inoculadas nas sementes apresentou-se maior em solo autoclavado do que em solo não-autoclavado. As rizobactérias 23, L4-11, L4-2, L4-1, 7(0), SBAR2, 20-2, CBCO3, 15(0), 13-1, SBAR3, 24-1,

19-1 apresentaram um aumento significativo no crescimento da parte aérea das plantas de tomate em solo autoclavado, enquanto a bactéria 23 também o apresentou em solo não-autoclavado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGUILAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology*, Reding, 134(9): 2741-6, 1988.
- ALSTROM, S. & BURNS, R. G. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, New York, 7(3): 232-8, 1989.
- ANDERSON, A.J.; HABIBZADEGAH-TARI, P.; TEPPER, C.S. Molecular studies on the role of the root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 54(2): 375-80, 1988.
- ARSHAD, M. & FRANKENBERGER, W. T. Jr. Biosynthesis of ethylene by *Cremonium falciforme*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 21(5): 633-8, 1989.

- ASTROM, B. Role of bacterial cyanide production in differential reaction of plant cultivars to deleterious rhizosphere pseudomonads. *Plant and Soil*, Dordrecht, 133(1): 93-100, 1991.
- BAHME, J. B. & SCHROTH, M. N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*, St. Paul, 77(7): 1093-100, 1987.
- BAHME, J. B.; SCHROTH, M. N.; Van GURDY, S. D.; WEINHOLD, A. R.; TOLENTINO, D. M. Effect of inocular delivery systems on rhizobacterial colonization of underground organs of potato. *Phytopathology*, St. Paul, 78(5): 534-42, 1988.
- BAKER, K. F. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Reviews in Phytopathology*, Palo Alto, 25: 67-85, 1987.
- BAKKER, F.A.H.M.; BAKKER, A. W.; MARUGG, J. D.; WEISBEEK, F. J.; SCHIPPERS, B. Bioassay for studying the role of siderophore in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato rotations, *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 19(4): 443-9, 1987.

BAKKER, P.A.H.M. ; LAMERS, J. G.; BAKKER, A. W.; MARUGG, J. D.; WEISBEEK, P. J.; SCHIFFERS, B. The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato, Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, 92(6): 249-56, 1986.

BARTZ, J.A. Relation between resistances of tomato fruit to infiltration by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and bacterial soft rot. Plant Disease, St. Paul, 75(2): 152-5, 1991.

BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carries for slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 51(5): 1089-98, 1986.

BEAUCHAMP, C. J.; DION, P.; KLOEPPER, J. W.; ANTOUN, H. Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. Plant and Soil, Dordrecht, 132(2): 273-9, 1991.

- BENNETT, R. A. & LYNCH, J. M. Bacterial growth and development in the rizosphere of gnotobiotic cereal plants. *Journal of General Microbiology*, Reading, 125(1):95-102, 1981.
- BOWEN, G. D. & ROVIRA, A. D. Microbial colonization of plant roots. *Annual Reviews in Phytopathology*, Palo Alto, 14, 121-44, 1976.
- BRANDÃO, E. M. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas de milho. Piracicaba, 1989. 130 p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BROADBENT, P.; BAKER, K. F.; FRANKS N.; HOLLAND, J. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontread soil. *Phytopathology*, St. Paul, 67(8): 1027-34, 1977.
- BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 35: 443-445, 1972.
- BROWN, M. E. Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 12: 181-97, 1974.

BROWN, M.E. & BURLINGHAN, S. K. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*, Reding, 53(1): 135-44, 1968.

BROWN, M. E.; BURLINGHAN, S. K.; JACKSON, R. M. Studies on *Azotobacter* species in soil. II. Populations of *Azotobacter* in the rhizosphere and effects of artificial inoculation. *Plant and Soil*, Dordrecht, 17(3): 320-32, 1962.

BROWN, M. E.; BURLINGHAN, S. K.; JACKSON, R. M. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effects of artificial inoculation on crops yields. *Plant and Soil*, Dordrecht, 20(2): 194-214, 1964.

BROWN, M. E.; JACKSON, R. M.; BURLINGHAN, S. K. Effects produced on tomato plants *Lycopersicum esculentum* by seed on root treatment with gibberelic acid and indolyl-3-acetic acid. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 19(60): 544-52, 1968.

BURPEE, L. L. The influence of abiotic factors on biological control of soilborn plant pathogenic fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guesph, 12(3): 308-17, 1990.

- BURR, P. J.; SCHROTH, M. N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Phytopathology*, St. Paul, 68(10):1395-401, 1978.
- BUYER, J. S. & LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 261(2): 791-794, 1986.
- BUYER, J. S. & SIKORA, L. J. Rhizosphere interactions and siderophores. *Plant and Soil*, Dordrecht, 129(1): 101-107, 1990.
- CAMPBELL, R. & CLOR, A. Soil moisture affects the interaction between *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and antagonistic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 17(4): 441-6, 1985.
- CAMPBELL, R. & EPHGRAVE, J. M. Effects of bentonite clay on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and on its interactions with antagonistic bacteria. *Journal of General Microbiology*, Reading, 129(3): 771-7, 1983.

- CAPPAERT, M. R.; POWELSON, M. L.; FRANE, G. D.; HARRISON, M. D. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot *Erwinias* for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology*, St. Paul, 78(12): 1658-72, 1988.
- CAPPER, A. L. & CAMPBELL, R. The effect of inoculated antagonistic bacteria on the prevalence of take-all disease of wheat in field experiments. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 60(2): 155-60, 1986.
- CHANG, I.-pin & KOMMEDAHL, T. Biological control seedling of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology*, St. Paul, 58(10): 1395-401, 1968.
- CHAO, W. L.; NELSON, E. B.; HARMAN, G. E.; HOCH, H. C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*, St. Paul, 76(1): 60-5, 1986.
- CHET, I.; ORDENCLICH, A.; SHAPIRA, R.; OFFENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil*, Dordrecht, 129(1): 85-92, 1990.

- COLYER, P. D. & MOUNT, M. S. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. *Plant Disease*, St. Paul, 68(8): 703-706, 1984.
- COOK, R. J. & BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- COSTERTON, J. W. Direct ultrastructural examination of adherent bacterial populations in natural and pathogenic ecosystems. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A.. **Current perspectives in microbial ecology**, Washington, American Society of Microbiology, 1984. p. 115-23.
- DE BOER, S. H.; CUPPELS, D. A.; KELMAN, A. Pectolytic *Erwinia* spp. in the root zone of potato plants in relation to infestation of daughter tubers. *Phytopathology*, St. Paul, 68(12): 1784-90, 1978.
- DE WEGER, L. A.; JANN, B.; JANN, K.; LUGTENBERG, B. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. *Journal of Bacteriology*, Washington, 169(4): 1441-6, 1987.

- DHANVANTARI, R. N. & DIRKS, V. A. Bacterial stem rot of greenhouse tomato: ethiology, spatial distribution and effect of high humidity. *Phytopathology*, St. Paul, 77(10): 1457-63, 1987.
- DUPLER, M. & BAKER, R. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 74(2): 195-200, 1984.
- EKLUND, E. & SINDA, E. Establishment and disappearance of introduced pseudomonads in the rhizoplan of peat grown cucumber plants. *Plant and Soil*, Dordrecht, 35: 495-504, 1971.
- ELAD, Y. & CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology*, St. Paul, 77(2): 190-5, 1987.
- ELAD, Y.; CHET, I.; BAKER, R. Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. *Plant and Soil*, Dordrecht, 98(3): 325-30, 1987.

FAGES, J. & ARSAC, J. F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, Dordrecht, 137(1): 87-90, 1991.

FOSTER, R. C. The ultrastructure of rhizoplane and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 14: 121-44, 1986.

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

FRAVEL, D. R.; LUMSDEN, R. D.; ROBERTS, D. F. In situ visualization of the biocontrol rhizobacterium *Enterobacter cloacae* with bioluminescence. *Plant and Soil*, Dordrecht, 125(2): 233-38, 1990.

FRAVEL, D. R.; MAROIS, J. J.; LUMSDEN, R. D.; CONNICK Jr., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*, St. Paul, 75(7): 774-7, 1985.

GALLI, F. Manual de Fitopatologia , 2 ed., São Paulo, Ceres, 1980, 587 p.

GANS, P.T. A comparison of methods to evaluate the susceptibility of potato cultivars to blackleg (caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) in the field at different sites. Plant Pathology, Oxford, 40(3): 238-48, 1991.

GEELS, F. P. & SCHIPPERS, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, 108(3-4):207-14, 1983a.

GEELS, F. P.; SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, 108(3-4):193-206, 1983b

GEORGE, H. L.; MOUNT, M. S.; BERMAN, P. M. Cellular localization of pectic enzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Phytopathology, St. Paul, 81(12): 134-9, 1991.

- GROSS, D. C. Regulation of synringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 58: 167-74, 1985.
- GUTTERSON, N.; ZIEGLE, J. S.; WARREN, G. J.; LAYTON, T. J. Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *Journal of Bacteriology*, Washington, 170(1): 380-5, 1988.
- HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* ant with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, St. Paul, 69(5): 480-2, 1979.
- HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Suppression of *Fythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, St. Paul, 70(8): 712-5, 1980.
- HOWIE, W.J. & ECHANDI, E. Rhibacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 15(2): 127-32, 1983.

HOWIE, W.J. & SUSLOW, T. Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology*, St. Paul, 76(10): 1069, 1986.

HOWIE, W.J.; COOK, R. J.; WELLER, D. M. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*, St. Paul, 77(2): 286-92, 1987.

HUSSAIN, A.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, A.; HUSSAIN, F. Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biology and Fertility of soils*, Berlin, 4(1): 73-7, 1987.

JAMES Jr., D. W.; SUSLOW, T.V.; STEINBACK, K.E. Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 50(2): 392-397, 1985.

- JUNKE, M. E.; MATHRE, D. E.; SANDS, E. C. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53(12): 2793-9, 1987.
- KATZNELSON, H. & COLE, S. E. Production of gibberellin like substances by bacteria and actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 11: 733-41, 1965.
- KAVINANDAN, S.K. & GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* spp. on phosphate uptake and yield maize. *Current Science*, Bangalore, 40: 439-40, 1971.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, St. Louis, 44(2): 301-7, 1954.
- KLOEPPER, J. W. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology*, St. Paul, 73(2): 217-9, 1983.

- KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, St. Paul, 71(6): 590-2, 1981a.
- KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, St. Paul, 71(6): 642-4, 1981b.
- KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 1020-4, 1981c.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, 7(2): 39-44, 1989.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N.; MILLER, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato development and yield. *Phytopathology*, St. Paul, 70(11): 1078-82, 1980a.

- KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZ, M.; SCHROTH, M. N.
Enhanced plant growth by plant growth promoting
rhizobacteria. *Nature*, London, 286(5776): 885-6, 1980b.
- KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZ, M.; SCHROTH, M. N.
Pseudomonads siderophores: mechanism explaining disease
suppressive soil. *Current Microbiology*, New York, 4:
317-20, 1980c.
- LAN, S. T.; ELLIS, D. M.; LIGON, J. M. Genetic approaches
for studying rhizosphere colonization. *Plant and Soil*,
Dordrecht, 129(1): 11-18, 1990.
- LEBEN, S. D.; WADI, J. A.; EASTON, G. D. Effects of
Pseudomonas fluorescens on potato plant growth and
control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, St.
Paul, 77(11): 1592-1595, 1987.
- LEISINGER, T. & MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the
fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*,
Washington, 43: 422-42, 1979.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible
role in the biocontrol of plant pathogones. *Annual
Review Phytopathology*, Palo Alto, 24: 187-209, 1986.

- LIAO, C.H. & WELLS, J.M. Diversity of pectolitic fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produced markets. *Phytopathology*, St. Paul, 77(5): 673-7, 1987.
- LIFSHITZ, R.; SIMONSON, C.; SCHER, F. M.; KLOEPPER, J. W.; RODRICK-SEMPLE, C.; ZALESKA, I. Effect of rhizobacteria on the severity of phytophthora root of soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, 8(1): 102-6, 1986.
- LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J. W.; KOSLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J. ; YIPPING, E. M. ; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 33(5): 390-5, 1987.
- LOAKE, G. J.; ASHBY, A. M.; SHAW, C. H. Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *Journal of General Microbiology*, Reading, 134(5): 1427-1432, 1988.

- LOPER, J. E. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology*, St. Paul, 78(2): 166-72, 1988.
- LOPER, J.E. & SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, St. Paul, 76(4): 386-9, 1986.
- LOPER, J. E.; HAACK, C.; SCHROTH, M. N. Populations dynamic of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 49(2): 416-22, 1985.
- LOPER, J. E.; SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Lognormal distribution of bacterial population in the rhizosphere. *Phytopathology*, St. Paul, 74(12): 1454-60, 1984.
- MAGAZIN, M. D.; MOORS, J. C.; LEONG, J. Cloning of the gene coding for the cutter membrane receptor protein for ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting *Pseudomonas* strain. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 261(2): 795-9, 1986.

- Mc DOUGALL, E. M. Movement of ^{14}C -photosynthate into the roots of wheat seedlings and exudation of ^{14}C - from intact roots. *New Phytologist*, 69(1): 37-46, 1970.
- MERRIMAN, P. R.; PRICE, R. D.; KOLLMORGEN, J. F.; FIGGOTT, T.; RIDGE, E. H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Australian Journal Agricultural Research*, Melbourne, 25: 219-26, 1974.
- MISAGHI, I. J.; STOWELL, L. T.; GROGAN, R. G.; SPEARMAN, J. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, St. Paul, 72(1): 33-5, 1982.
- MUGNIER, J. & JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 50(1): 108-14, 1985.
- NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. *Annual Review Biochemistry*, Palo Alto, 50: 715-31, 1981.
- NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil*, Dordrecht, 129(1): 61-73, 1990.

PARKE, J. L.; RAND, R. E.; JOY, A. E.; KING, E. B.
Biological control of *Pythium* damping-off and
Aphanomyces root rot of peas by application of
Pseudomonas cepacea or *fluorescens* to seed. *Plant*
Disease, St. Paul, 75(10): 987-92, 1991.

PEROMBELON, M. C. M. Blackleg and other potato diseases
caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of
terminology. *Plant Diseases*, St. Paul, 71(8): 283-5,
1987.

POWELSON, M.L. Potato early dying disease in the pacific
northwest caused by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*.
American Potato Journal, Orono , 62(4): 173-6, 1985.

POWELSON, M.L. & APPLE, J.D. Soil and seed tubers as
source of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*
for stem rot of potatoes. *Phytopathology*, St. Paul,
74(4): 429-32, 1984.

RANDHAWA, P. S. & SCHAAD, N. W. A seedling bioassay
chamber for determining bacterial colonization and
antagonism on plant roots. *Phytopathology*, St. Paul,
75(3): 254-9, 1985.

- RHODES, D.J. & LOGAN, C. Effects of fluorescent pseudomonads on potato blackleg syndrome. *Annals of Applied Biology*, Warwickshire, 108: 511-8, 1986.
- RHODES, D.J. & LOGAN, C. A method for selecting fluorescent pseudomonads inhibitory to seed tuber decay. *Potato Research*, Wageningen, 30: 603-11, 1987.
- ROBBS, C.F. *Erwinia chrysanthemi*: agente de uma "podridão mole" de cebolinha. *Fitopatologia Brasileira*, Piracicaba, 5(3): 453, 1980.
- ROBBS, C.F. Taxonomia, bio-ecologia e principais representantes do gênero *Erwinia* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Piracicaba, 6(2): 304-5, 1981.
- ROSENZWEIG, W. D. & STOTZKY, G. Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: clay minerals and pH. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 38(6): 1120-6, 1979.
- ROVIRA, A.D. Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effect on maize, tomato and wheat. *Plant and Soil*, Dordrecht, 19(3): 304-14, 1963.

- ROVIRA, A. D. Plant root exudates. *Botanical Review*, Bronx, 35: 35-7, 1969.
- ROVIRA, A. D. & SANDS, D. C. Fluorescent pseudomonads - a residual component in the soil microflora? *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 34: 253-9, 1971.
- ROVIRA, A. D.; NEWMAN, E. I.; BOWEN, H. J.; CAMPBELL, R. Quantitative assessment of the rhizoplane microflora direct microscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 6(4): 211-6, 1974.
- SCHER, F.N. & BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 72(2): 1567-73, 1982.
- SCHER, F.N.; KLOEPPER, J. W.; SINGLETON, C. Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates "in vitro" and soil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 31(6): 570-574, 1985.

- SCHER, F.N.; KLOEPPER, J. W.; SINGLETON, C.; ZALESKA, I.; LALIBERT, M. Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. *Phytopathology*, St. Paul, 70(11): 1055-1059, 1988.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 25: 339-58, 1987.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN PEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, Dordrecht, 129(1): 75-83, 1990.
- SCHROTH, M. N. & HANCOCK, J. G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 35: 453-76, 1981.
- SCHROTH, M. N. & HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, Washington, 216(4553): 1376-81, 1982

- SCHROTH, M. N.; LOPER, J. E.; HILDEBRAND, D.C. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A. Current perspectives in microbial ecology. Washington, Am. Soc. Microbiol., 1984. p.362-9.
- SERFONTEIN, S.; LOGAN, G. C.; SWANEPOEL, A. E.; ROELEMA, B. H.; THERON, D. J. A potato wilt disease in South Africa caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Plant Pathology, Oxford, 40(3): 382-6, 1991.
- STANGHELLINI, M. E. & RASMUSSEN, S. L. Root prints: a technique for the determination of the in situ spatial distribution of bacteria on the rhizoplane of field-grown plants. Phytopathology, St. Paul, 79(10): 1131-34, 1989.
- SUSLOW, T.V. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M. & LACY, F. Phytopathogenic Prokaryotes. New York, Academic Press, 1982. V.1, p.187-223.
- SUSLOW, T.V. & SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. Phytopathology, St. Paul, 72(1): 111-5, 1982a.

- SUSLOW, T. V. & SCHROTH, M. N. Rhizobacteria of sugar beet: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, St. Paul, 72(2): 199-206, 1982b.
- TAKATSU, A. Erwinias do grupo *carotovora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Piracicaba, 8(3): 535-6, 1983.
- TARI, P. H.; ANDERSON, A. J. *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 54(8): 2037-41, 1988.
- TOMASHOW, L. S. & WELLER, D. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 170(8): 3499-508, 1988.
- TURNER, J. T. & BACKMAN, F. A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, St. Paul, 75(4): 347-53, 1991.

VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 35(4): 456-63, 1988.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HASS, D.; DEFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* suppress black root rot of tobacco under gnotobiotics conditions. *EMBO Journal*, Oxon, 8: 351-8, 1989.

WELLER, D. M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology*, St. Paul, 73(11): 1548-53, 1983.

WELLER, D. M. Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 48(5): 897-9, 1984.

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

WELLER, D. M. & COOK, R. J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, St. Paul, 73(3): 463-9, 1983.

WELLER, D. M.; ZHANG, B.; COOK, R. J. Application of a rapid screening test for selection bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease*, St. Paul, 69(8): 710-3, 1985.

WONG, F. T. W. & BAKER, R. Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus patch* by fluorescent pseudomonads from fusarium-suppressive soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 15(4): 397-403, 1984.

XU, G.W. & GROSS, D. C. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology*, St. Paul, 76(4): 414-22, 1986a.

XU, G.W. & GROSS, D. C. Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora*, and potato yields. *Phytopathology*, St. Paul, 76(4): 423-30, 1986b.