ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO.

EDGAR MOREIRA BRANDÃO

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. ELKE J.B.N. CARDOSO

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.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
novembro-1989

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO

Edgar Moreira Brandão

Aprovado em: 27/12/1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Francisco de A.F. Mello	ESALQ/USP
Prof. Dr. Jorge de Castro Kiehl	ESALQ/USP
Profª Drª Aline Ap. Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP

Prof. Dr. Francisco de A.F. Mello
Substituindo o Orientador

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

Brandão, Edgar Moreira
B817i Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas de milho. Piracicaba, 1989.
132p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria - Crescimento 2. Bactéria - Isolamento 3. Bactéria - Seleção 4. Milho - Crescimento 5. Solo - Microbiologia I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 631.46

Na ribeira deste rio
Ou na ribeira daquele
Passam meus dias a fio
Nada me impede, me impele
Me dá calor ou da frio

Vou vendo que o rio faz
Quando o rio não faz nada
Vejo os rastros que ele traz
Numa sequência arrastada
Do que ficou para trás

Vou vendo e vou meditando
Não bem no rio que passa
Mas só no que estou pensando
Porque o bem dêle é que faça
Eu não ver que vai passando

Vou na ribeira do rio
Que está aqui ou ali
E do seu curso me fio
Porque, se o vi ou não vi
Ele passa e eu confio

(Fernando Pessoa)

Aos meus pais, Antonio e Neyde,

e à vocês, minhas irmãs,

Suely e Simone.

OFEREÇO

Vontade de ser sozinho
Sem medo do que passou
A taça do mesmo vinho
Sem brinde, mas por favor
Não é que eu não tenha amigos, não
Não é que eu não dê valor
Mas hoje é preciso a solidão
Em nome do que acabou

Vontade de ser sozinho
Mas por uma causa sã
Trocar o calor do ninho
Pelo frio da manhã
Valeu a orquestra, se valeu
Agora é flauta de pã
Hoje é preciso a solidão
Com a benção do deus tupã

E a quem perguntar quando o vento sopra
Responda que já soprou
Mas o vento não traz resposta acabou...

(Oswaldo Montenegro)

Por tudo que te amo
Por tudo que se sonha
Por todo esse carinho
Por todos esses anos
Por todos os momentos
Com todo sentimento
A você, ROSI

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Elke J.B.N. Cardoso, por sua orientação, e tudo o mais que as palavras não descrevem;

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Ferraz de Mello pela colaboração;

Ao Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes, onde foi possivel a realização deste trabalho;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro;

A Agroceres pela cessão das sementes;

Aos Prof. Rivaldo Chagas Mafra e Newton Pereira Stanford da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo incentivo;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes, Denise de Lourdes Colombo Mescolotti e Luiz Fernando Baldesin, bem como à Carla B.N. Cardoso pelo auxílio prestado, mas principalmente por sua grande amizade;

Aos amigos André Luiz Catani, Marcelo Cabral Jahnel, Marcio Rodrigues Lambais e família, Maria do Carmo Esteves, Paulo Robson de Souza e família, Rosângela Barbosa Navarro, Sonia de Barros Ostiz, Vanderlei Antunes e Yun Su Kim pelos diversos momentos compartilhados;

A Adriana Parada Dias da Silveira pelas sugestões, discussão e amizade que conduziram à conclusão deste trabalho;

A Profa. Regina Ayr Florio da Cunha da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por sua contribuição;

A Profa. Sonia Vieira da Faculdade de Odontologia - UNICAMP e ao Prof. Carlos Tadeu dos Santos Dias da UNESP - Botucatu por suas sugestões na parte de estatística;

A Maria Isabel de Almeida Prado e Egberto Pereira Goeldi, por tudo;

A todos aqueles que, apesar de não citados, foram importantes para a realização deste trabalho.

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
RESUMO.....	ixx
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇAO.....	1
2. REVISAO DE LITERATURA.....	3
2.1. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP).....	3
2.2. Colonização das raízes.....	10
2.2.1. O processo de colonização das raízes.....	11
2.2.2. Fatores que afetam a colonização das raízes.....	15
2.2.3. Características de competência rizosférica.....	18
2.3. Modo de ação.....	21
2.3.1. Produção de substâncias promotoras do crescimento.....	22
2.3.2. Solubilização do fósforo.....	22
2.3.3. Mecanismo de supressão de patógenos.....	23
2.3.3.1. Competição por substratos e exclusão de nicho.....	23

Página

a. Efeito das práticas culturais..... 26

2.3.3.2. Controle biológico de doenças de plantas..... 29

a. Seleção de uma bactéria como agente do biocontrole..... 33

b. Formulação de agentes para o biocontrole.....

c. Razões possíveis para uma performance inconstante..... 36

c.1. Perda da eficiência ecológica..... 36

c.2. Patógeno alvo ausente ou interferência de patógeno não alvo..... 37

c.3. Variação da colonização das raízes pelas bactérias.... 38

2.3.3.3. Produção de sideróforos... 41

2.3.3.4. Produção de antibióticos... 50

3. MATERIAL E METODOS..... 55

3.1. Obtenção dos isolados..... 55

Página

3.2. Preparo das soluções estoque das drogas..... 56

3.3. Determinação dos níveis de resistência a estreptomicina..... 57

3.4. Marcação genética dos isolados através de resistência a antibióticos..... 58

3.5. Planta..... 59

3.6. Solos..... 59

3.7. Inoculação das sementes..... 60

3.8. Avaliação da ocorrência natural de resistência aos antibióticos utilizados como marcadores..... 62

3.9. Avaliação da capacidade de colonização dos mutantes em condições controladas..... 63

3.10. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento pelos mutantes RIF-NAL em casa de vegetação - EXPERIMENTO 1..... 64

3.11. Avaliação da capacidade de promoção da emergência e do crescimento das plântulas em casa de vegetação - EXPERIMENTO 2..... 65

Página

3.12. Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em casa de vegetação - EXPERIMENTO 3..... 66

3.13. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento de diferentes mutantes em casa de vegetação - EXPERIMENTO 4..... 68

3.14. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento em diferentes épocas de colheita - EXPERIMENTO 5 68

3.15. Colheita e variáveis determinadas.. 69

3.16. Análise estatistica..... 70

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 71

4.1. Determinações preliminares..... 71

4.1.1. Determinação dos niveis de resistência à estreptomicina. 71

4.1.2. Marcação genética dos isolados através de resistência a antibióticos..... 76

4.1.3. Avaliação da ocorrência natural de resistência aos antibióticos utilizados como marcadores..... 77

4.1.4. Avaliação da capacidade de colonização dos mutantes em

Página

condições controladas..... 78

4.2. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento pelos mutantes RIFNAL, em casa de vegetação-EXPERIMENTO 1..... 79

4.3. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento e emergência das plântulas, em casa de vegetação- EXPERIMENTO 2..... 81

4.3.1. Promoção da emergência das plântulas..... 82

4.3.2. Promoção do crescimento..... 84

4.4. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento, em casa de vegetação - EXPERIMENTO 3..... 94

4.5. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento de diferentes mutantes, em casa de vegetação - EXPERIMENTO 4..... 100

4.6. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento em diferentes épocas de colheita - EXPERIMENTO 5..... 105

5. CONCLUSÕES..... 112

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela — Página

1 - Análise química dos solos utilizados nos diferentes experimentos..... 61

2 - Caracterização e procedência dos isolados utilizados no EXPERIMENTO 2..... 65

3 - Caracterização e procedência dos isolados utilizados no EXPERIMENTO 3..... 67

4 - Distribuição dos diferentes tipos de mutantes obtidos a partir dos 69 isolados utilizados..... 77

5 - Total dos diferentes mutantes obtidos a partir dos 69 isolados..... 77

6 - Número de unidades formadoras de colônias (ufc/ml) por grama de raiz após uma semana da emergência das plântulas (média de 3 repetições)..... 78

7 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST), comprimento do sitema radicular (CSR) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com os mutantes RN,em amostras de solo da série Ribeirão Claro em condições naturais, RN aos 20 dias após a semea-

Tabela Página

dura (média de 5 repetições)..... 80

8 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho, inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz, em condições naturais e esterilizadas - EXPERIMENTO 2..... 85

9 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições)..... 86

10 - Matéria seca do sistema radicular (MSSR) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5

Tabela Página

repetições)..... 87

11 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições)..... 88

12 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST)(média de 5 repetições)..... 89

13 - Matéria seca do sistema radicular (MSSR)e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se solo da Série Luiz de Queiroz esterelizadas (LQ EST)(média de 5 repetições)..... 90

14 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas

Tabela Página

com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST)(média de 5 repetições)..... 92

15 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, nos três tipos de amostras de solo utilizadas. 96

16 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições)..... 97

17 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação

Tabela Página

ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT (média de 5 repetições)..... 98

18 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST)(média de 5 repetições)..... 99

19 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho, inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT)..... 101

20 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual (V.P.), em relação

Tabela Página

ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições)..... 102

21 - Matéria seca do sistema radicular (MSSR) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT)(média de 5 repetições)..... 103

22 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizado (LQ EST) (média de 5 repetições)..... 104

23 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de plantas de milho,

Tabela Página

inoculadas com diferentes isolados aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a semeadura, utilizando-se amostras solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT)..... 106

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1 -	Distribuição dos níveis de resisitência à estreptomicina pelos isolados, após 24h de incubação.....	73
2 -	Distribuição dos níveis de resisitência à estreptomicina pelos isolados, após 48h de incubação.....	74
3 -	Distribuição dos níveis de resisitência à estreptomicina pelos isolados, após 72h de incubação.....	75
4 -	Efeito da inoculação dos isolados 41RN, 136RN e P144 sobre a emergência de plântulas de milho, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT), observadas durante 5 dias após a semeadura (média de 5 repetições).....	83
5 -	Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (méria de 5 repetições).....	100

Figura Página

6 - Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca do sistema radicular (MSSR) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições)..... 109

07 - Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca total (MST) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições)..... 110

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO.

Autor: Edgar Moreira Brandão

Orientadora: Elke J.B.N. Cardoso

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de promoção do crescimento de plantas de milho, através da inoculação das sementes com diferentes isolados de bactérias fluorescentes pertecentes ao gênero **Pseudomonas**, caracterizadas ecologicamente como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs).

Para tanto, foram isoladas bactérias fluorescentes de rizosfera de milho, as quais foram marcadas geneticamente através da obtenção de mutantes espontâneos resistentes à rifampicina e ácido nalidíxico, com o intuito de avaliar a capacidade de colonização dos isolados em condições de solo natural. Testou-se também a utilização da estreptomicina como marcador, no entanto mutantes resistentes ao referido antibiótico não apresentaram diferenças na capacidade de colonização, bem como na promoção do crescimento.

Experimentos em casa de vegetação foram realizados em amostras de Areias Quartzosas, Série Ribeirão Claro - naturais (RC NAT) e de Terra Roxa Estruturada, Série Luiz de Queiroz- naturais (LQ NAT) e esterilizadas (LQ EST).

Para efeito de comparação foram introduzidos nos experimentos isolados de RPCPs com eficiência previamente comprovada.

Avaliou-se também a capacidade de promoção da emergência de plântulas, bem como à promoção do crescimento em diferentes épocas do ciclo da cultura.

Com relação à capacidade de promoção do crescimento foram observadas variações de acordo com o isolado utilizado e a condição do solo.

No solo LQ NAT, observou-se antecipação da emergência de plântulas em três dias, quando comparados ao controle, devido à inoculação dos isolados 41RN e 136RN.

O crescimento das plantas de milho foi afetado pela introdução dos isolados 41RN e 136RN aos 75 e 90 dias após a semeadura.

ISOLATION AND SELECTION OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA IN MAIZE.

Candidate: Edgar Moreira Brandão

Adviser: Elke J.B.N. Cardoso

This research was carried out in order to study the potential to promote maize growth by seed inoculation with different strains of fluorescent pseudomonads, ecologicaly characterized as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR).

Rhizosphere colonizing bacteria were isolated from freshly harvested, field-grown maize roots, and antibiotic-resistant strains were selected for resistance to rifampicin and nalidixic acid, for monitoring the colonization, after introduction into natural soil. Strains with spontaneous streptomycin resistance were evaluated, but no difference between the colonization capacities of the strains and plant growth-promoting was observed.

The soils used in the greenhouse experiments were a non sterilized (natural) Quartz Sand, series Ribeirão Claro (RC NAT) and a Terra Roxa Estruturada, series Luiz de Queiroz, sterilized (LQ EST) and nonsterilized (LQ NAT).

Eficient PGPR strains, obtained from different researchers
were included in the experiments.

Promotion in seedling emergence and the effect on plant-growth promotion during the plant cycle were evaluated.

Plant-growth promotion was variable, according to soil conditions and pseudomonads strain.

Bacterial strains 41RN and 136RN antecipated in three days the emergence promotion in LQ NAT soil, but no effect was observed in LQ EST soil.

In the time-course experiment the strains 41RN and 136RN affected plant growth-promotion after 75 and 90 days.

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais são responsáveis por grande parte do suprimento de carboidratos, proteinas e vitaminas para o homen e animais. Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de incrementar a produção agrícola para suprir a grande demanda de alimentos.

O estudo de microrganismos, que em determinadas condições podem ser benéficos para as plantas, apresenta-se hoje, como uma das mais atrativas áreas de investigação dentro da Microbiologia Agrícola .

A utilização de bactérias do gênero **Rhizobium** em leguminosas, que através da fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico confere maior desenvolvimento e produção, bem como a associação de fungos micorrízicos com raizes de plantas, aumentando o volume de solo explorado e o acesso a nutrientes que possam limitar o desenvolvimento vegetal, são exemplos concretos da utilização de microrganismos benéficos para as plantas.

Os primeiros trabalhos sobre inoculação de sementes foram realizados, na sua maioria, com os gêneros **Azotobacter**, **Bacillus** e **Clostridium**. Entretanto,

posteriormente, foi observado que o gênero **Pseudomonas** apresentava-se de forma predominante na superfície das raízes de plantas em desenvolvimento, o que estimulou o estudo das possíveis relações entre esses dois organismos.

Vários estudos demonstraram que a inoculação de sementes, tubérculos ou raízes com **Pseudomonas** estimulava o crescimento das plantas, tanto em condições controladas como no campo, o que levou essas bactérias a serem denominadas de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP).

A possibilidade de utilização de RPCP na manipulação da microbiota da rizosfera, a fim de se obter um incremento no crescimento das plantas, ainda necessita de melhores estudos.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram obter isolados de **Pseudomonas** sp. de rizosfera de milho, e posteriormente, selecioná-los quanto à capacidade de promover o desenvolvimento das plantas, visando sua utilização como inoculante de sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

Existem vários grupos de bactérias que, sob certas condições, são benéficas para as plantas. O tratamento de sementes de leguminosas com **Rhizobium**, uma bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico, com a qual se produzem e comercializam inoculantes em todo o mundo, apresenta-se, hoje, como o exemplo mais conhecido. O tratamento de sementes, tubérculos ou raizes com culturas de bactérias é denominado "bacterização", e tais preparações são chamadas de "fertilizantes bacterianos".

Segundo BROWN (1974), outras bactérias, principalmente dos gêneros **Azotobacter**, **Bacillus**, **Clostridium** e **Pseudomonas**, foram aplicadas como inoculantes, promovendo o crescimento de plantas. Na União Soviética, em 1958, cerca de 10^7 ha eram tratados com bactérias, as quais beneficiaram 50 a 70% dos campos produtivos, aumentando a produção de 10 a 20%. No entanto, a maioria destes trabalhos apresentavam falhas, devido aos resultados inconstantes e à falta de uma análise estatística apropriada (COOPER,1959).

Nessa época foram realizados os primeiros estudos sobre bacterização que utilizaram isolados de **Azotobacter chroococcum**, denominado "azotobacterin" e **Bacillus megaterium**, "phosphobacterin". O azotobacterin, por ser um fixador de nitrogênio atmosférico, e o phosphobacterin, por mineralizar o fósforo orgânico, tornando-o disponivel para a planta, foram considerados estimuladores do crescimento de plantas.

Após a revisão de COOPER (1959), foi realizada uma série de experimentos contendo uma análise estatística apropriada. Respostas positivas foram obtidas com inoculação de **Azotobacter** em trigo, tomate e milho (ROVIRA, 1963; BROWN **et alii**,1962; BROWN **et alii**, 1964). Mais tarde, após as observações de BROWN & BURLINGHAM (1968) e BROWN **et alii** (1968), sobre a existência de quantidades mensuráveis de ácido giberélico e ácido indol-acético em culturas de **Azotobacter**, foi sugerido o possivel efeito dessas substâncias sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Bacillus spp. foi também utilizado como inoculante de sementes por KOMEDAL & NEW (1975) e CHANG & KOMEDAHL (1968), os quais demonstraram a habilidade do **Bacillus subtilis** no controle de **Fusarium roseum** f.sp. **cerealis** "**graminearum**" em milho. JÁ ROVIRA (1963) obteve, de forma similar, aumentos significativos no crescimento de milho, tomate e trigo, pela inoculação de sementes com

Clostridium.

Inicialmente, os trabalhos com bacterização de sementes utilizavam, em sua maioria, **Azotobacter chroococcum**, **Bacillus** sp. e **Clostridium.** No entanto, ROVIRA (1963), realizando uma avaliação da habilidade do **Azotobacter** em colonizar as raizes, demonstrou que este não se apresentava como um bom colonizador, e que, por sua vez, **Bacillus** e **Clostridium** eram colonizadores moderados, uma vez que colonizavam apenas 10 a 20% do nível de colonização de **Pseudomonas.** Esses resultados corroboraram com os achados de ROUATT & KATZNELSON (1961), que compararam o número e os tipos de bactérias encontradas na rizosfera e no solo, concluindo que o gênero **Pseudomonas** era predominante na rizosfera de trigo, aumentando, assim, o interesse no estudo dessa bactéria.

Com a avaliação dos efeitos secundários da inoculação de **Pseudomonas** em sementes de pepino, EKLUND (1970) concluiu que essas bactérias produziam substâncias como giberelinas e auxinas, responsáveis pelo crescimento de plantas.

Tais informações provocaram maior investigação à procura de bactérias do gênero **Pseudomonas**, no intuito de obter isolados que promovessem o crescimento de plantas.

O interesse neste grupo de bactérias foi incentivado por estudos iniciados na Universidade da

Califórnia, em Berkeley, durante a década de 70, onde foi observado que a população microbiana da rizosfera poderia ser alterada pela introdução de isolados especificos de **Pseudomonas** fluorescentes. Estes isolados induziam um aumento no crescimento das plantas e foram denominados PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) (KLOEPPER **et alii**, 1988).

O termo rizobactéria foi criado para descrever as bactérias que possuem a habilidade de colonizar agressivamente o sistema radicular. Essas bactérias podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua relação com a planta: benéficas, deletérias e neutras. Uma distinção deve ser feita entre as "bactérias do rizoplano e da rizosfera" uma vez que estas terminologias são utilizadas para identificar as bactérias isoladas de uma região sem levar em consideração sua função e população, pois, não sendo colonizadoras de raizes e podendo muitas vezes serem transitórias, podem ser isoladas por acaso (SCHROTH & HANCOK, 1981; SCHROTH & HANCOK, 1982).

Inicialmente, BURR **et alii** (1978) obtiveram aumentos significativos no crescimento e produção de batata através da inoculação de duas espécies de **Pseudomonas** (**P. fluorescens** e **P. putida**), mergulhando batatas-sementes em uma suspenssão contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (ufc) por ml, antes do plantio. A seleção foi realizada partindo-se de mais de 100 bactérias, as quais foram

isoladas da superfície de batata e que apresentavam antibiose **in vitro** contra **Erwinia carotovora** var. **carotovora**. Todos os isolados foram testados em casa de vegetação, mas apenas três apresentaram respostas positivas na promoção do crescimento. Os resultados foram similares quanto à eficiência, tanto em condições de casa de vegetação como de campo.

KLOEPPER **et alii** (1980a), por sua vez, selecionaram isolados de RPCP (Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas) em batata, sem avaliar, contudo, a presença de antibiose **in vitro**. Utilizando mutantes de RPCPs resistentes à rifampicina e ácido nalidíxico, foi avaliada a colonização de rizosfera de plantas, logo após a sua emergência. Dos 58 isolados testados, cinco estimularam o crescimento de plantas de batata, provocando um aumento acima de 500% de crescimento em relação às plantas controle. As plantas inoculadas apresentavam ainda maior desenvolvimento do sistema radicular e maior número de ramificações.

---

1 KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radish. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOLOGY BACTERIA,4., Ontario, 1978. **Proceedings**. Tours, Gilbert-Clarey, 1978. v.2, p.879-82.

Em experimento realizado por KLOEPPER & SCHROTH [1], citado por BURR & CAESAR (1985), para a seleção de RPCP em rabanete, 11 dos 53 isolados testados promoveram o crescimento das plantas em casa de vegetação. Esta alta percentagem (cerca de 10% dos isolados) pode indicar que em culturas de ciclo curto, como o rabanete, a bactéria apresenta melhores condições para sobreviver durante todo o ciclo da cultura, o que não acontece nas culturas de ciclo mais longo.

O uso de antibiose **in vitro** e a colonização do isolado em germinadores plásticos assépticos foram os critérios utilizados por SUSLOW & SCHROTH (1982b) para a seleção de isolados de RPCP em beterraba açucareira. Dos 123 isolados testados em casa de vegetação, oito promoveram o crescimento das plantas e, dos 84 selecionados por predominância na raiz, e que não apresentavam antibiose, três promoveram o crescimento das plantas e mais tarde apresentaram inibição do crescimento de bactérias e fungos **in vitro.**

Estes dados levaram à conclusão de que, nem todos os isolados que exibem antibiose estimulam o crescimento da planta , e que a maioria, dos RPCPs é antagonista de vários microganismos **in vitro.**

Certas bactérias colonizadoras de raízes, incluindo as **Pseudomonas**, induzem aumentos na emergência das plântulas. Este fenômeno foi descrito inicialmente por

KLOEPPER **et alii** (1986) com isolados que causaram aumentos significativos nas taxas de emergência de plântulas de soja e colza, em condições de campo com baixas temperaturas, no Canadá. Esta nova clase de isolados de RPCP foi denominada RPE (Rizobactérias Promotoras da Emergência de Plantas), porém, o modo de ação ainda é desconhecido.

Isolados específicos de **Pseudomonas** estimulam a nodulação de leguminosas por **Rhizobium** e **Bradyrhizobium.** GRIMES & MOUNT (1984) observaram que **Pseudomonas putida** (M17), selecionado como agente para o controle biológico, aumentou acentuadamente a nodulação por **Rhizobium** em plantas de feijão. Semelhantemente, POLONEKO **et alii** (1987) testaram os efeitos de certos isolados de **Pseudomonas** sobre a nodulação de soja por **Bradyrhizobium japonicum**, observando aumentos na nodulação e crescimento das plantas em condições de campo. Esses isolados foram denominados RPN (Rizobactérias Promotoras da Nodulação). Esses autores sugeriram que os RPNs poderiam ser incorporados nas formulações de inoculantes para leguminosas, a fim de melhorar a performance destes produtos. O modo de ação dos RPNs está sendo investigado.

2.2. Colonização das raizes

Os microrganismos coexistem na natureza em constante interação. Muitos fatores podem influenciar no estabelecimento, sobrevivência e sucesso da utilização desses microrganismos em busca de benefício para a planta.

No estudo da interação de RPCP com plantas superiores, pode ser observado que as raizes das plantas são colonizadas abundantemente. Isto nos sugere a necessidade de uma íntima relação entre bactérias e hospedeiro para que ocorram benefícios no crescimento da planta e na proteção contra doenças.

Vários fatores como: temperatura, luminosidade, umidade do solo, fertilidade e aeração, bem como outros fatores físicos e ambientais que afetam o crescimento da planta e a exudação das raizes, devem influenciar, de maneira acentuada, o estabelecimento da microbiota rizosférica.

Em 1959, ROVIRA demonstrou o efeito da idade da planta, da luminosidade, da temperatura e da nutrição de cálcio sobre a quantidade e natureza dos aminoácidos exsudatos pelas raizes. EKLUND (1970), avaliando a colonização de **Pseudomonas** em raizes de pepino, observou uma predominância das bactérias em mudas, com o número de células foi decrescendo até ficarem escassas após cinco semanas. SUSLOW & SCHROTH (1982b) demonstraram que isolados

de **Pseudomonas**, quando inoculados em sementes de beterraba açucareira, colonizaram as raízes e persistiram através da fase de crescimento vegetativo da planta, alcançando populações de 10^4 ufc/cm de raiz. Em controles não inoculados a população de **Pseudomonas** fluorescentes variou de 90 a 500 ufc/cm de raiz. Resultados semelhantes foram obtidos por KLOEPPER & SCHROTH[1], citados por BURR & CAESAR (1985), onde isolados resistentes à rifampicina e ao ácido nalidíxico colonizaram o sistema radicular de plantas, com populações de $9,6 \times 10^5$ ufc observadas duas semanas após a emergência e, em média, 10^3 ufc durante o ciclo da cultura.

2.2.1. O processo de colonização das raízes

Em trabalho publicado por HOWIE **et alii** (1987) foi levantada a hipótese de que a colonização de raízes de trigo por **P. fluorescens** ocorre 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. Na fase II a bactéria se mutiplica, 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 com o término da primeira.

A fase I se inicia com o primeiro contato da bactéria inoculada com as raízes que estão emergindo. Durante o alongamento dessas raízes algumas bactérias são levadas por suas extremidades, enquanto outras são deixadas para trás tornando-se uma fonte de inóculo nas porções velhas das raízes (WELLER, 1984). A multiplicação das bactérias nas extremidades das raízes permitiria, assim, o transporte das mesmas por toda a raiz mas, sem a multiplicação, o transporte ocorreria somente até que o inóculo inicial, que está presente na extremidade, ser totalmente diluído (WELLER, 1988). BULL[2], citado por WELLER (1988), apresentou evidências para a fase I, demonstrando que bactérias de diversos nichos ecológicos, como **P. fluorescens** 2-79 e Q72a-80 (agente de biocontrole de raízes de trigo), **Escherichia coli**, **P. syringae**, **Xanthomonas campestris**, **Erwinia carotovora** e **E. herbicola** (as quais não são agentes de biocontrole), aderem igualmente bem às raízes de trigo. Além disso, após terem sidos aplicadas em sementes de trigo, as quais foram plantadas em solo natural, essas

---

[2] BULL, C.T. Wheat root colonization by desease-supressive or nonsupressive bacteria and effect of population size on severity of take-all caused by **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici**. Pullman, 1987. 75p. (M.S. - Washington State University)

bactérias foram detectadas em igual número ao longo da raiz, na ausência de água de percolação, quatro dias após o plantio. A população de todos os isolados ao longo das raízes individuais declinou, linearmente, da semente para a extremidade.

O transporte de bactérias pela extremidade das raízes é, algumas vezes, ineficiente e as extremidades nem sempre se tornam ou permanecem colonizadas (BAHME & SCHROTH, 1987). BULL[2], citado por WELLER (1988), amostrou raízes emergentes de sementes de trigo tratadas com **P. fluorescens** 2-79 logo após o plantio e não detectou a bactéria em 20-40% das raízes. A ausência de uma bactéria introduzida na extremidade da raiz pode ocorrer por remoção física, causada pelo deslocamento devido à adsorção às partículas do solo, ou mesmo, através da competição com bactérias nativas (BAHME & SCHROTH, 1987).

O primeiro problema pode ser oriundo de certa inabilidade da bactéria, em, algumas vezes, não se multiplicar com a velocidade compatível com a do crescimento da raiz, a qual se estende rapidamente pelo solo (2-9 cm/dia), por expansão das células nas zonas de alongamento (10 a 20 vezes seu tamanho original) (FOSTER, 1986).

O destino final de uma bactéria introduzida é governado pela sua capacidade de competição com a microbiota nativa durante a fase II.

As bactérias com competência rizosférica podem multiplicar-se e sobreviver nas raízes, ao passo que as que não apresentam esta característica são rapidamente deslocadas. Utilizando o isolado de **P. fluorescens** 2-79 (agente de biocontrole) em semente de trigo, BULL[2], citado por WELLER (1988), demonstrou que, após 14 dias, a sua população dessa bactéria na rizosfera era muito maior do que a das bactérias que não eram agentes de biocontrole, em solo natural. No entanto, a população total de bactérias foi aproximadamente a mesma nas raízes, quando em solo pasteurizado.

DUPLER & BAKER (1984), demonstraram que, quando as bactérias foram adicionadas ao solo biologicamente ativo, o isolado de **P. putida** colonizou a rizosfera de rabanete menos eficientemente do que quando o mesmo solo foi submetido à secagem ao ar antes do teste, afim de reduzir a atividade microbiana. Isto sugere que a competição, provavelmente, foi maior no primeiro caso.

Durante a colonização da rizosfera os nutrientes podem ser um fator limitante na competição entre bactérias. Observações diretas de raízes no solo demonstraram que a maior parte da superfície da raiz não é colonizada, e que as bactérias tendem a se congregar em cavidades intercelulares, onde os nutrientes podem ser mais abundantes (BOWEN & ROVIRA, 1976).

Uma vez que a capacidade de transporte da rizosfera é limitada, um isolado introduzido deve ocupar o espaço de uma bactéria nativa para se estabelecer. Assim, como resposta para a introdução deste isolado, a população total não deve mudar, e sim, sua composição é que deve ser alterada (WELLER, 1983).

2.2.2. Fatores que afetam a colonização da raiz

A colonização da raiz pelas bactérias introduzidas durante a fase I, juntamente com sua propagação e sobrevivência durante a fase II, são profundamente afetadas por fatores bióticos e abióticos.

HOWIE **et alii** (1987) estudaram o efeito do potencial matricial da rizosfera sobre as fases I e II em raizes de trigo colonizadas por **P. fluorescens** 2-79, aplicada na semente. As maiores populações ocorreram 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 que as células bacterianas se desenvolvessem. DUPLER & BAKER (1984), observaram também a capacidade de sobrevivência de **P. putida** quando da lenta secagem do solo até -100 bar. De um ponto de vista prático é encorajador que a bactéria introduzida possa se difundir do material plantado para as raizes em uma larga faixa de potencial

matricial (WELLER, 1988). Segundo HOWIE **et alii** (1987), o transporte de bactérias com o alongamento das raízes (fase I) não requer água de percolação, porém a presença desta pode aumentar o movimento bacteriano (BAHME & SCHROTH , 1987; PARKE **et alii**, 1986).

Em um experimento de campo, BAHME & SCHROTH (1987) monitoraram a distribuição espacial de **P. fluorescens** A1-B em raízes de batata antes e depois da irrigação. A água moveu as células de A1-B das batatas-sementes em direção ao solo e redistribuiu a população de A1-B que havia se estabelecido nas raízes antes da irrigação, o que resultou em um aumento da população nas proximidades da extremidade das raízes. Esses pesquisadores levantaram a hipótese de que a água de percolação poderia servir para estender a população bacteriana introduzida em direção às extremidades das raízes.

O movimento de bactérias pelo solo, através da água, é afetado por características da própria bactéria, tais como forma, tamanho, motilidade e carga eletrostática, bem como pelas características do solo, como natureza, tamanho e distribuição dos poros, conteúdo de água e pH. Canais deixados por raízes velhas e animais, além de possíveis espaços na interface solo-raiz, devido ao encolhimento diurno e intumescência, podem permitir um movimento descendente das bactérias mais rápido na água do que ocorre ao longo da raiz, em um solo com potencial de

água mais uniforme (PAKER **et alii**, 1986). Assim, o efeito do movimento da água sobre a bactéria deve ser melhor estudado em condições de campo ou amostras não deformadas de solos.

LOPER **et alii** (1985) descrevem que a temperatura ideal para o crescimento de **P. fluorescens** e **P. putida in vitro** está entre 25 e 30 °C, no entanto, a colonização por essas bactérias é geralmente incrementada a 12 ou 18 °C. A atividade microbiana do solo aumenta com o aumento da temperatura; assim, espera-se melhores colonizações a temperaturas mais baixas, o que, provavelmente, reflete a menor competição com a microbiota nativa.

Com relação ao pH, o crescimento dessas bactérias comporta-se de maneira similar. Segundo HOWIE[3] (1985), citado por WELLER (1988), enquanto estas tendem a crescer melhor **in vitro**, em pH neutro ou acima, a colonização de raízes de trigo po **P. fluorescens** 2-79 foi maior na rizosfera com pH 6,0-6,5, do que 7,0 ou acima. Este fato ocorre, provavelmente, devido a uma competição com bactérias nativas da rizosfera em condições ácidas.

---

[3] HOWIE,W.J. Factors affecting colonization of wheat roots and supression of take-all by pseudomonads antagonistic to **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici**. Pullman, 1979. 82p. (Ph.D - Washington State University).

Microrganismos nativos podem também aumentar a colonização das raízes por uma bactéria introduzida. WELLER (1983) observou que a população bacteriana nativa, gram negativa, de **Pseudomonas** sp. e da bactéria introduzida **P. fluorescens** 2-79 em raízes de trigo, foram maiores quando as raízes estavam infectadas por **G. graminis** var. **tritici** do que quando as raízes estavam sadias.

2.2.3. Características de competência rizosférica

Concomitantemente com uma condição ambiental favorável na rizosfera, o sucesso de uma colonização por um período longo, requer que a bactéria introduzida apresente características intrínsecas de competência rizosférica, que envolvem a adesão, distribuição e sobrevivência. De uma maneira geral, as características das bactérias que contribuem para a sua competência rizosférica são, em sua maioria, desconhecidas.

A produção de fímbrias, que são estruturas protéicas comumente produzidas por bactérias gram negativas, cuja função está associada com a adesão a diferentes organismos e substratos, foi observada por VESPER (1987), em **P. fluorescens** 2-79, apresentando uma correlação com a capacidade de adesão das células em raízes de milho.

Por sua vez, a importância do flagelo no movimento das bactérias no solo têm sido amplamente

estudado. GRIFFIN & QUAIL (1968) mostraram que, apesar de sua função, o movimento das bactérias devido ao flagelo não pode ocorrer em solos com potencial matricial próximo ou abaixo de -0,5 bar, devido ao filme de água tornar-se muito fino e os poros preenchidos de água serem pequenos e descontínuos. HOWIE **et alii** (1987) descrevem que mutantes não flagelados de **P. fluorescens** R72-80R, R1a-80R e R4a-80R colonizaram raízes de trigo em dois diferentes solos de forma semelhante aos diferentes parentais, com potencial matricial de -0,2 bar (favorável à motilidade) e -2,0 bar (não favorável à motilidade). Isto indicaria claramente a não essencialidade dos flagelos para o movimento bacteriano, ao longo das raízes de trigo.

Em contrapartida DE WEGER **et alii** (1987) reportaram que os quatro mutantes não flagelados de **P. fluorescens** WCS 374 aplicados em plântulas de batata, tendo as raízes cerca de 1 cm de comprimento, desenvolveram, significativamente, uma população mais baixa do que os seus parentais, em raízes a uma profundidade de 8cm. Esses autores concluiram, assim, que a motilidade é requerida para a colonização de raízes de batata em crescimento.

Esses achados conflitantes sobre o papel dos flagelos podem ser atribuídos a possíveis diferenças nos isolados, na espécie de planta, nas condições físicas do solo e, particularmente, na umidade.

HOWIE **et alii** (1987) conduziram suas investigações em potencial matricial controlado. Em contraste, no trabalho desenvolvido por DE WEGER **et alii** (1987) não houve o controle do potencial matricial, permitindo um umedecimento do solo por baixo. E possível notar que, caso o solo possuisse um potencial matricial superior àquele estudado por HOWIE **et alii**, o movimento bacteriano poderia ter sido substancialmente menor. E nítido que, segundo os trabalhos acima citados, quando características bacterianas, potencialmente importantes na colonização de raízes, estão sendo estudadas, as condições do solo devem ser rigorosamente controladas para evitar a introdução de múltiplas variáveis experimentais.

Quando existe um potencial matricial adequado no solo para a motilidade, a quimiotaxia em direção às sementes e/ou aos exsudatos das raízes pode contribuir para a habilidade da bactéria em colonizar raízes.

A quimiotaxia pode ser especialmente importante quando as bactérias são adicionadas ao solo ou no sulco de plantio, não estando assim em contato com a planta.

SCHER **et alii** (1985) demonstraram quimiotaxia de **Pseudomonas** fluorescentes com exsudatos de sementes de soja, em solos saturados com água. Foi encontrado que **P. putida** RW1 movia 1 cm em direção à semente de soja em 12 horas. Algum tempo depois, BASHAN (1986b) observou que, em condições de solo esterilizado, próximo à capacidade de

campo, **P. fluorescens** 82011 migrava vários centimetros em direção às raizes de trigo, porém se locomovia menos no solo quando as raizes de trigo estavam ausentes. Por sua vez, ARORA **et alii** (1983) observaram que **P. fluorescens** e **P. putida** eram atraídas por substâncias liberadas por conídios de **Cochliobolus victoriasa** e escleródio de **Macrophomina phaseolina.**

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. Com a planta transpirando ativamente, o potencial matricial da interface solo-raiz varia, podendo tornar-se muito baixo durante os períodos de alta evapotranspiração. LOPER **et alii** (1985), demonstraram relação entre tolerância osmótica e tamanho da população de oito isolados de **Pseudomonas** em raizes de batata.

2.3. Modo de ação

A forma pela qual a RPCP estimula o crescimento das plantas ainda não é conhecida. O conhecimento sobre os possíveis mecanismos envolvidos neste processo é de primordial importância para que se possa selecionar os isolados mais eficientes. Vários mecanismos têm sido propostos a fim de conhecer esses processos.

2.3.1. Produção de substâncias promotoras do crescimento

Muitos pesquisadores têm obtido isolados de **Bacillus**, **Azotobacter** e **Pseudomonas** que produzem substâncias como giberelinas, auxinas e citoqininas, responsáveis pelo crescimento de plantas (BROWN & BURLINGHAM, 1968; BROWN **et alii**, 1968; BROWN, 1964; EKLUND, 1970; KATZNELSON & COLE, 1965).

Sob certas condições, essas substâncias produzidas pelos microrganismos poderiam resultar na estimulação do crescimento das plantas. No entanto, seria necessário o perfeito estabelecimento desses organismos na rizosfera, o que aparentemente ocorre apenas com o gênero **Pseudomonas** (EKLUND, 1970).

2.3.2. Solubilização do fósforo

O fósforo se apresenta no solo como fosfato inorgânico produzido pela intemperização das rochas, ou como fosfato orgânico derivado de resíduos de plantas, animais e microrganismos. Usualmente, menos de 5% do total de fosfato no solo está disponível para a planta. Alguns microrganismos, no entanto, possuem a capacidade de solubilizar o fósforo inorgânico tornando-o disponível.

A inoculação de sementes de milho com **Pseudomonas** sp. provocou um aumento na produção de matéria seca e na absorção de fosfato, segundo KAVIMANDAN & GAUR (1971); porém não se pode afirmar que essa absorção foi elevada devido à solubilização pelo microrganismo.

Entretanto, em estudo recente, LIFSHTZ **et alii** (1987) demonstraram que um isolado de **Pseudomonas putida** aumentou a absorção de ^{32}P-fosfato por plantas de colza. A inoculação de sementes com este isolado resultou em um aumento significativo do nível de ^{32}P no sistema radicular e na parte aérea. Uma análise de regressão linear indicou correlações significativas entre o comprimento do sistema radicular e o nível de ^{32}P nas raízes, bem como, entre o comprimento do sistema radicular e o nível de ^{32}P na parte aérea.

2.3.3. Mecanismos de supressão de patógenos

2.3.3.1. Competição por substratos e exclusão de nicho

A competição por nutrientes fornecidos pelas raízes e exsudatos de sementes, provavelmente, ocorre na maioria das interações entre bactérias e patógenos. O estabelecimento de uma grande população de bactérias no material de plantio e raízes provoca uma diminuição dos

nutrientes da rizosfera, reduzindo assim a quantidade de carbono e nitrogênio disponível para estimular a germinação dos esporos de fungos patógenicos ou para a colonização subsequente de raízes (ELAD & BAKER, 1985b; ELAD & CHET, 1987).

Pseudomonas fluorescentes são especialmente adaptadas para utilizar os nutrientes, uma vez que são nutricionalmente versáteis e crescem rapidamente na rizosfera.

Aqui, é interessante relembrar o conceito de sítios preferenciais e zona de influência. BENNET & LYNCH (1981), ROVIRA (1979), SCHIPPERS & van VUURDE (1978) e outros têm demonstrado que somente uma pequena percentagem da raiz é realmente colonizada por bactérias. Os números obtidos variam aproximadamente 8 a 20% da superfície disponível da raiz, ou seja, certas áreas da raiz, tais como junções de células e pontos de emergência de raízes laterais, parecem favorecer a colonização, uma vez que os exsudatos são abundantes nestas regiões, comportando-se como sítios preferenciais para colonização.

Recentemente, estão aumentando as evidências de que a microbiota saprofítica da rizosfera inclui elementos deletérios e benéficos, que possuem potencial de influenciar o desenvolvimento e produção das plantas de forma significativa (BURR & CAESAR, 1984; FREDERICKSON & ELLIOTT, 1985; KLOEPPER &SCHROTH, 1981b; SCHROTH & HANCOCK,

1982; SUSLOW, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1980 e 1982).

Uma das hipóteses levantadas para explicar a habilidade de algumas rizobactérias promoverem o crescimento das plantas, seria a sua capacidade de colonizar agressivamente o sistema radicular, resultando em uma substituição ou exclusão de componentes deletérios da microbiota das raízes (SCHROTH & HANCOCK, 1981; SCHROTH & HANCOCK, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1982).

As RBDs (rizobactérias deletérias) são consideradas como patógenos menores, ou seja, aqueles saprófitas ou parasitas confinados a tecidos juvenis como pêlos radiculares, extremidades de raízes e células corticais, que afetam o crescimento das plantas pela produção de metabólitos, os quais alteram o suprimento de água, íons e substâncias de crescimento das plantas. Isto causa redução na germinação, distorção nas raízes, lesões, redução do alongamento e aumento da infecção por fungos (BURR & CAESAR, 1984; GEELS & SCHIPPERS, 1983a; SCHROTH & HANCOCK, 1982; SUSLOW, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1982).

Em beterraba açucareira, as RBDs são freqüentemente encontradas em maior número do que as RPCPs durante o isolamento. Estudos em culturas comerciais desta planta mostrou que as RBDs podem compreender de 18 a 20% dos isolados de bactérias, enquanto as RPCPs representam somente 3 a 5% da população. As RBDs foram encontradas em todos os estádios de desenvolvimento das plantas, de

seedling a raízes de mudas. Da mesma forma, as RBDs têm sido isolados de uma variedade grande de plantas incluindo trigo, milho, alface e feijão (SUSLOW,1982).

Um aspecto interessante na identificação de RBD é o fato de que seus efeitos deletérios às plantas são observados em solo esterilizado e em solo natural, contrastando com a inoculação de RPCPs onde efeitos significativos somente são observados em solo natural (SUSLOW & SCHROTH, 1982b).

Utilizando-se isolados de RBD marcados com resistência a rifampicina e ácido nalidíxico, foi demonstrado que o tratamento com o isolado de RPCP SH 5 impediu ou reduziu a colonização de RBD nas raízes. Plantas com alta densidade populacional de RBD tiveram sintomas típicos de encurtamento de raízes, enrolamento, ausência de pêlos radiculares e necroses. Tem sido subseqüentemente observado um decréscimo parcial de RBD insensível à antibiose **in vitro** por SH 5, na colonização de raízes, devido à elevada taxa de crescimento do SH 5. Logo, se os RPCPs colonizam primeiro as raízes, os RBD não as colonizam com o mesmo potencial.

a. - Efeito das práticas culturais

A promoção do crescimento e os efeitos no aumento da produção de solos fumigados, pasteurizados,

tratados com pesticidas ou a introdução de antagonistas muitas vezes não podem ser explicados pelo aumento da disponibilidade de nutrientes, melhoramento na estrutura do solo ou supressão de nematóides e patógenos maiores. Estes problemas nos levam a crer que os RDBs, ou patógenos menores, estão envolvidos na redução do crescimento das plantas e da produção (BURR & CAESAR, 1984; SUSLOW, 1982). Apesar da maioria dos solos de campo possuir populações de patógenos menores ou RBD, seus efeitos na saúde da planta, bem como na produção, parecem tornar-se cada vez mais pronunciados através de certas práticas culturais.

Pesquisadores holandeses têm demonstrado que a freqüência da produção de batata no campo afeta a habilidade dos RPCPs em melhorar o crescimento das plantas. Quando batatas foram produzidas em um mesmo campo a cada três anos (rotação curta), a produção mostrou-se de 10 a 15% menor do que a cada seis anos (rotação longa) e 30% menor quando o cultivo foi realizado continuadamente. Essas informações sugerem que fatores microbianos, outros que patógenos reconhecidos, são o principal fator no declínio observado (SCHIPPERS **et alii**, 1987; BAKKER **et alii**, 1986; GEELS **et alii**, 1986).

O retardamento no crescimento vegetal pode ser reproduzido em experimentos realizados em um período de dois meses com vasos, em casa de vegetação, utilizando-se solos obtidos de campos com diferentes freqüências de

cultivo de batata (GEELS & SCHIPPERS, 1983b).

Outro dado interessante é mostrado por BAKKER & SCHIPPERS (1987) onde, segundo esses autores, a supressão de cianida pruduzida por RBD seria a causa da promoção de crescimento de batata pelos RPCPs. A cianida é um metabólito secundário de vários microrganismos. Ela pode ser produzida diretamente da glicina ou prolina, e de glicosídios cianogênicos, todos observados nos exsudatos de raizes. Aproximadamente 4% das bactérias aeróbias, isoladas sobre tripic soy agar (TSA), de rizosfera de batata e trigo, crescidas em solos com rotações curtas e longas, têm o potencial de produzir cianida . Sabe-se também que, pelo menos 40% das Pseudomonas de rizosfera de batata foram capazes de produzir cianida **in vitro**. Além disso a produção de hidrogenocianida por bactéria está provavelmente, envolvida na inibição do metabolismo energético.

Em experimentos **in vitro**, a via respiratória do citocromo de raizes de batata intactas foi muito sensível à cianida, sendo mais de 40% inibido por 5 uM de HCN.

As concentrações de P e K de plantas de batata de rotações curtas foram significativamente mais baixas em relação àquelas de rotação longa, apesar da disponibilidade desses dois elementos ser a mesma em ambos os solos ou até mesmo ser maior no solo de curta rotação. Essas observações suportam a hipótese de que as baixas produções de batata em rotações curtas podem, ao menos

parcialmente, ser originadas da redução na absorção de nutrientes, causada por uma depressão no metabolismo energético imposto pelo HCN.

A produção de cianida por isolados de **Pseudomonas** spp. foi demonstrada ser dependente da disponibilidade de Fe^{+3}, devendo ser, desta forma, particularmente influenciada pela competição por ferro com PGPRs produtores de sideróforos específicos.

2.3.3.2. Controle biológico de doenças de plantas

Para a realização de um controle biológico de doenças, através da bacterização de sementes, é necessário que a bactéria inoculada se multiplique na rizosfera e iniba os microrganismos patogênicos, através de competição e antibiose. Se a bactéria se multiplicar na rizosfera de uma planta após sua emergência, mas não conseguir sobreviver durante todo o ciclo da cultura, não será obtido um controle permanente; no entanto, será conseguida uma inibição da ação dos patógenos que causam doenças em mudas.

BURR **et alii** (1978) conseguiram um aumento significativo na produção de batata através da inoculação de isolados específicos de **P.fluorescens** e **P. putida**, e atribuíram esse efeito ao controle da canela preta e podridão mole da batata, doença causada por **Erwinia**

carotovora var. **carotovora**. Posteriormente, SUSLOW & SCHROTH (1982b) obtiveram respostas similares em beterraba açucareira. KLOEPPER (1983), com a aplicação de RPCP em batatas-sementes, antes do plantio, obteve uma redução significativa na população de **E. carotovora** nas raizes de batata, em experimento de campo, sugerindo que o RPCP pode ser usado no controle dessa doença.

Em trabalho publicado por SMILEY (1978a, 1978b) vários isolados de **Pseudomonas** sp., em rizosfera de trigo, foram inibidores do desenvolvimento da podridão do pé causada pelo fungo **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici**. Foi observado que a taxa de crescimento das hifas do referido fungo foi menor nos solos em que a fonte de nitrogênio utilizada foi NH_4^+, quando comparada com o uso de NO_3^-; além disso, houve maior antagonismo **in vitro**, das colônias isoladas do tratamento com NH_4^+, sugerindo que a supressão da podridão do pé de trigo, através da utilização de diferentes tipos de fertilizantes nitrogenados, é causada, pelo menos em parte, pelo antagonismo de **Pseudomonas** sp. a **G. graminis**.

A prodidão do pé é, provavelmente, a doença mais importante do trigo. Devido a falta de resistência da planta hospedeira e do controle químico econômico, o biocontrole, utilizando-se bactérias está sendo intensivamente estudado (CAMPBELL & CLOR, 1985; CAMPBELL & ÉPHGRAVE, 1983; CAPPER & CAMPBELL, 1986; WELLWR & COOK,

1983; WELLER **et alii**, 1985; WELLER **et alii**, 1988; WONG & BAKER, 1984).

WELLER & COOK em 1983 isolaram **Pseudomonas** fluorescentes de raízes de trigo cultivado em amostras de solo de um campo onde ocorria o declínio da podridão do pé. Este declínio, uma forma de biocontrole natural, é expresso como um decréscimo espontâneo na severidade da doença e concomitante aumento na produção em monocultura de trigo. As **Pseudomonas** fluorescentes foram testadas no controle da podridão do pé, devido ao fato delas poderem ter influência papel no declínio da doença.

Foi observado também, que **P. fluorescens** 2-79 (NRRL B = 15132) isolada, ou junto com 13-79 (NRRL B = 15134), suprimiu a podridão do pé em trigo de primavera e de inverno, quando aplicada como tratamento de semente. A produção foi aumentada em média 17% em canteiros experimentais, sendo que a combinação dos isolados foi superior a cada isolado sozinho, em cerca de 50% dos testes (WELLER & COOK, 1983; WELLER **et alii**, 1985).

A aplicação conjunta dos isolados resultou numa melhor estimulação da microbiota natural, responsável pelo declínio da podridão do pé. O isolado de RPCP 2-79 é um colonizador de raiz agressivo, podendo ser isolado de trigo durante todo o período de desenvolvimento da planta. Quando aplicado como tratamento de semente, compreende 50% da população total de **Pseudomonas** fluorescentes nas raízes, por

um período de até dois meses após o plantio (WELLER, 1983).

SCHER & BAKER (1980) conseguiram induzir a supressividade em um solo condutivo a **Fusarium**, após a autoclavagem desse solo, a inoculação com **Fusarium oxysporum** f.sp. **lini** e a transferência de pequenas quantidades de um solo supressivo a **Fusarium oxysporum** f.sp. **dianthi**, causador de murcha de linho e cravo. Isolados de **Pseudomonas** foram obtidos do micélio do fungo, sugerindo que a supressividade a **Fusarium**, no solo utilizado, era de origem biológica e o controle da doença poderia ser realizado através da inoculação de espécies apropriadas de bactérias nos solos condutivos.

FREITAS & PIZZINATO (1989) demonstraram o efeito do isolado de **Pseudomonas** sp. Ps-5B, proveniente da rizosfera de trigo, no controle de incidência de murcha causada po **Fusarium oxysporum** f. sp. **lycopersici** em tomateiro cultivado em solo esterilizado e não-esterilizado.

a. - Seleção de uma bactéria como agente de biocontrole

Devido às condições econômicas e ao longo tempo requerido para testes em condições de campo, métodos mais apropriados são necessários para a seleção de isolados com potencial de eficiência comprovada. Existem indícios de que menos de 10% da população de bactérias na rizosfera

sejam rizobactérias habilitadas para a realização do controle biológico (SCHROTH & HANCOCK, 1981, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1982; WELLER & COOK,1986).

A seleção de isolados eficientes pode ser aperfeiçoada procedendo-se um primeiro isolamento destas bactérias na mesma condição ambiental na qual elas serão utilizadas. O isolamento de solos supressivos a patógenos pode aumentar, em grande escala, as chances de que seja encontrado um isolado eficiente.

Existem evidências de que as **Pseudomonas** têm um papel na supressividade de certos solos para **Fusarium**, causadores de murcha em linho, rabanete e pepino (SCHER & BAKER, 1982), da podridão do pé de trigo e da podridão negra de raízes de tabaco (STUTZ **et alii**, 1986). A percentagem de **Pseudomonas** fluorescentes supressivas da podridão do pé, em bioensaios em casa-de-vegetação (WELLER **et alii**, 1985; WELLER **et alii**, 1988), apresentou-se maior quando as bactérias foram isoladas de raízes de trigo cultivado em solos supressivos (de campos que sofreram declínio de podridão do pé) do que quando em solos não supressivos. Não existe relação entre a atividade da bactéria em inibir o patógeno **in vitro** e suprimir a doença causada por aquele patógeno **in vivo**, ou seja, isolados produzindo grandes zonas de inibição sobre meio sólido, nem sempre serão melhores agentes de biocontrole (BAKER, 1968; SCHROTH & HANCOCK, 1981; WONG & BAKER, 1984).

Alguns experimentos **in vitro** têm sido modificados para poderem simular, mais realisticamente, as condições naturais. RHODES **et alii** em 1987 desenvolveram um ensaio com o intúito de pré-selecionar agentes de biocontrole de podridão de batata. Desta forma, antagonistas e patógenos são co-inoculados em uma fatia de batata e incubados por três dias a 20 °C, com posterior avaliação da extensão da podridão em comparação ao patógeno inoculado isoladamente. Por sua vez, RANDHAWA & SCHAAD (1985) desenvolveram uma câmara de plântulas que permite o estudo, em placa de Petri, do antagonista e do patógeno sobre as raizes. A seleção de isolados eficientes em condições de campo pode ser facilitada por ensaios em casa de vegetação. Com esse objetivo, têm sido desenvolvidos métodos nos quais seja possível selecionar antagonistas de **G. graminis** var. **tritici** (WELLER **et alii**, 1985), **Pythium** spp. (WELLER & COOK, 1986) em trigo, **E. carotovora** em batata (XU & GROSS, 1986a) e **Phytophthora megasperma** f.sp. **glicinea** em soja (LIFSHITZ et alii, 1986). Alguns fatores importantes nos ensaios são usualmente: potencial de inóculo do patogeno (WELLER **et alii**, 1985), condições ambientais (temperatura e conteúdo de umidade do solo) e dose da bactéria candidata (XU & GROSS, 1986).

Outra preocupação comum é a seleção de isolados com habilidade de colonizar as raizes sem visar o controle biológico (JUHNKE **et alii**, 1987), considerando

então, que o agente de biocontrole do patógeno de raiz deva ser um bom colonizador das mesmas.

Em 1981, BENNET & LYNCH desenvolveram um teste em tubo fechado com o intuito de avaliar a capacidade de colonização das raízes pela bactéria em condições gnotobióticas, utilizando areia esterilizada. Porém, em 1984, SCHER **et alii** melhoraram esta técnica utilizando solo natural para averiguar a habilidade das bactérias em colonizar raízes de milho.

KLOEPPER **et alii** (1985) apresentaram um método para selecionar colonizadores superiores da espermosfera, o qual envolvia um monitoramento da população bacteriana introduzida na espermosfera de soja, após esta ser inoculada nas sementes ou no solo.

b. - Formulação de agentes para o biocontrole

O controle biológico depende, sobretudo, do estabelecimento e manutenção de um limite populacional de bactérias no material plantado ou no solo, e uma alteração, para um nível inferior de viabilidade, pode eliminar a possibilidade desse controle (SUSLOW, 1982; XU & GROSS, 1986a). Muitos fatores edáficos, incluindo temperatura (LOPER **et alii**, 1985; WELLER & COOK, 1983), umidade do solo (BURR et alii, 1978; CAMPBELL & CLOR, 1985; DUPLER & BAKER, 1984), e pH e conteúdo de argila (CAMPBELL & EPHGRAVE, 1983;

ROSENZWEIG & STOTZKY, 1979), influenciam a sobrevivência, o estabelecimento da bactéria e sua interação com o patógeno. O modo pelo qual essas bactérias são cultivadas e processadas pode afetar sua viabilidade e tolerância às condições adversas.

Em 1981, KLOEPPER & SCHROTH desenvolveram uma formulação constituída de uma mistura do isolado com goma natural e talco. Posteriormente, vários estudos foram realizados a fim de se efetuar a inoculação com a utilização de géis poliméros, tais como goma natural ou alginato (BASHAN, 1986a; FRAVEL et alii, 1985 e MUGNIER & JUNG, 1985).

Por sua vez, GRAHAM-WEISS et alii (1987) estudaram a utilização de vermiculita suplementada com nutrientes na produção de inóculo.

c. - Razões possíveis para uma performance inconstante

c.1. - Perda da eficiência ecológica

A eficiência ecológica é a habilidade de uma bactéria em competir e sobreviver na natureza (SCHROTH et alii, 1984). Muitas características das bactérias (várias delas desconhecidas) contribuem para a eficiência ecológica na rizosfera, sendo que a perda de alguma pode reduzir a habilidade da bactéria em se estabelecer ou mesmo funcionar

sobre ou próximo às raízes.

Algumas características podem ser perdidas quando a bactéria é cultivada **in vitro** (SCHROTH **et alii**, 1984). Por exemplo, a bactéria na natureza, e quando primeiramente isolada, é envolvida por um exopolissacarídeo (EPS) (COSTERTON, 1984); no entanto, mutantes deficientes em EPS originam-se espontaneamente **in vitro** e, eventualmente, predominam na cultura, devido ao fato de se multiplicarem rapidamente. Tais mutantes podem ser menos capazes de sobreviver quando utilizados como agentes do biocontrole. Cultivos repetidos de **Pseudomonas** fluorescentes **in vitro** podem resultar na perda da eficiência no campo, provavelmente devido à mudança das células e morfologia da colônia, à perda de estruturas da superfície celular ou à redução na produção de antibióticos e sideróforos (CAESAR & BURR, 1987; SCHROTH **et alii**, 1984).

c.2. - Patógeno alvo ausente ou interferência de patógeno não alvo

Devido às bactérias agentes do biocontrole aumentarem o crescimento das plantas, por redução dos danos causados por patógenos, uma resposta positiva à sua introdução não ocorre quando as condições ambientais não são favoráveis para o desenvolvimento de doenças. Isto é claramente ilustrado pelos estudos com RPCP em batata, nos

Países Baixos, já descritos. O isolado **P. fluorescens** WC5374, **P. putida** WC5358 e outros, promoveram o crescimento e produção de batata em curta, mas não em longa rotação (GEELS & SCHIPPERS, 1983b; GEELS **et alii**, 1986; SCHIPPERS **et alii**, 1987). Logo, a performance dos isolados de RPCP poderá parecer muito inconstante se a história do cultivo não for considerada.

O efeito de patógenos outros que não o patógeno alvo se apresenta como outro problema. Caso a bactéria elimine somente um patógeno, tornando o outro predominante, o tratamento poderá parecer inefetivo.

c.3. - Variação da colonização das raízes pelas bactérias

É geralmente considerado que a colonização das raízes por bactérias introduzidas é essencial para o biocontrole de patógenos de raízes, e que aumentando a população de uma bactéria introduzida na raiz, seria de se esperar um aumento no controle da doença (SUSLOW, 1982). Somente poucos estudos (CAESAR & BURR, 1987; KLOEPPER, 1983; KLOEPPER & SCHROTH, 1981c; LEBEEN **et alii**, 1987; SUSLOW & SCHROTH, 1982b; XU & GROSS, 1986b) têm tentado avaliar a influência do tamanho da população bacteriana sobre a população do patógeno e da severidade da doença sobre as raízes.

XU & GROSS (1986) aplicaram **P. putida** W4P63 em sementes e monitoraram sua população e de **E. carotovora**, nessas mesmas raízes no campo. A população de W4P63 variou entre 10^4 a 10^5 ufc/g de raiz, enquanto que a população de **E. carotovora**, foi somente 10% da encontrada em raízes com W4P63.

BULL[2], citado por WELLER (1988), por sua vez, tratou sementes de trigo com doses crescentes de **P. fluorescens** 2-79 (aproximadamente 0, 10^2, 10^4, 10^6, 10^8 ufc/semente) e plantou-as em solo natural, infestado com o patógeno da podridão do pé. Neste caso, existiu uma relação linear direta entre a dose de 2-79 aplicada e a população que se desenvolveu sobre as raízes. Além disso, houve uma relação inversa entre a populaçao de 2-79 nas raízes e o número de lesões observadas. Este estudo demonstrou, conclusivamente, que a extensão do controle da podridão do pé está diretamente relacionada com a colonizacão das raízes.

Um modelo espaço/tempo da colonização das bactérias introduzidas em raízes individuais ofereceria melhor análise da capacidade de colonização dos isolados, da estabilidade da população nas raízes e da extensão da colonização. Tais modelos são raramente determinados, devido ao fato do seu estudo ser extremamente intensivo e trabalhoso (BAHME & SCHROTH, 1987). Ao invés disso, a população bacteriana das raízes normalmente é determinada a

partir de amostras dessas raízes (GEELS & SCHIPPERS, 1983; HOWIE & ECHANDI, 1983; JUNKE **et alii**, 1987; KLOEPPER, 1983; KLOEPPER **et alii**, 1980; SUSLOW & SCHROTH, 1982; WELLER, 1983; XU & GROSS 1986). Esse tipo de amostragem, entretanto, superestima a população da bactéria introduzida, uma vez que essa população apresenta-se logaritimicamente distribuída entre o sistema radicular de diferentes plantas (BAHME & SCHROTH, 1987; LOPER **et alii**, 1984) e entre raízes individuais de uma única planta (BAHME & SCHROTH, 1987).

Segundo LOPER **et alii** (1984), populações do isolado A1 ou SH 5 de RPCP introduzida em sistemas radiculares individuais de batata e em plântulas de beterraba açucareira apresentaram variações de 10 a 100 vezes em sua população. Houve também uma variação acima de 1000 vezes em populações de **P. fluorescens** 2-79 sobre raízes individuais de plântulas de trigo, BULL [2], citado por WELLER (1988), sendo que, 20 a 40% das raízes não haviam sido colonizadas quatro semanas após o plantio.

Em uma raiz a população bacteriana introduzida pode variar algumas unidades log 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**, 1987; WELLER, 1984). Quando são coletadas amostras de um sistema radicular ou raiz, possuindo uma grande população, obtem-se, em média, um

número desproporcional de bactérias, dando a impressão de que a colonização se processou de maneira superior à realidade.

Provavelmente, a principal razão para o comportamento inconstante dos agentes de biocontrole é a colonização da raiz, uma vez que ocorre variação de planta para planta e de raiz para raiz em uma mesma planta.

2.3.3.3. Produção de sideróforos

A maioria dos microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos respondem ao stress de ferro pela produção extracelular de um agente transportador de ferro (na forma +3), de baixo peso molecular (500-1000 daltons), designado sideróforo (do grego **sideros** = ferro; **phorós** = que leva, que conduz) (NEILANDS, 1981; LEONG, 1986), o qual complexa seletivamente o ferro (III) com alta afinidade. A função do sideróforo é, portanto, suprir de ferro a célula.

O produto de solubilidade do hidróxido de ferro é aproximadamente 10^{-38} e a concentração do ion férrico, solúvel a pH 7,0 é, aproximadamente, 10^{-17} M, a qual é muito baixa para sustentação do desenvolvimento microbiano. Logo, microrganismos ativos, em ambiente com ferro a tão baixo nível de disponibilidade, são aqueles que têm pelo menos alguma habilidade na produção de sideróforos.

Segundo LEONG (1986), a assimilação de ferro através do sideróforo se processaria da seguinte maneira: uma vez que os sideróforos férricos são normalmente muito grandes para se difundirem através dos pequenos canais completos com água (no envelope celular de bactérias gram negativas), o transporte ativo de ferro é iniciado por uma proteína receptora de sideróforos férricos, externa à membrana. A síntese dessa proteína receptora é usualmente induzida por condições limitantes de ferro. Além disso, algumas proteínas na membrana interna e periplasma são também requeridas para o transporte do sideróforo férrico. A liberação do íon ferro do complexo sideróforo-férrico ocorre, provavelmente, através de uma redução, uma vez que os sideróforos possuem pouca afinidade por ferro (II). Este ferro liberado é, então, incorporado em um constituinte celular, onde poderá interagir como ferro (III) com a proteína repressora, no intuito de regular a biossíntese de sideróforo e de proteína receptora.

Segundo NEILANDS (1981), ao lado de seu papel no transporte de ferro, os sideróforos podem atuar como fatores de crescimento, e alguns são descritos como antibióticos potentes.

Vários estudos identificaram os sideróforos verde-amarelo fluorescentes, produzidos pelas **Pseudomonas** fluorescentes benéficas, como fator envolvido na estimulação do crescimento das plantas. Esses isolados demonstraram, in

vitro, uma típica atividade bacteriostática a **E. carotovora**, causadora da podridão mole em batata, através da produção de zonas verde-amarelas fluorescentes, em meio de cultura com limitação de ferro, mas não em meio suplementado com 1 uM de $FeCl_3$ (KLOEPPER et alii, 1980b).

Durante ensaios em casa de vegetação, utilizando-se solo suplementado com ferro (III) na forma de etilenodiaminatetracetato de ferro III (FeEDTA), não foi observado nenhum incremento no crescimento das plantas em resposta aos vários isolados benéficos. Apesar disso, os isolados conseguiram colonizar as raizes de batata (KLOEPPER **et alii**, 1980b).

Com o objetivo de testar a hipótese de que os sideróforos de **Pseudomonas** fluorescentes promotoras do crescimento poderiam reproduzir a ação biológica desses isolados, aqueles autores purificaram a partir de culturas do isolado de **P. fluorescens** B-10, um sideróforo verde-amarelo, designado pseudobactin, em condições limitantes de ferro, e um sideróforo complexado com ferro, denominado pseudobactin férrico. O pseudobactin exibiu atividade bacteriostática a **E. carotovora**, enquanto que o pseudobactin férrico vermelho-marrom não demonstrou atividade, sugerindo, que a antibiose **in vitro**, à **E. carotovora**, por isolados benéficos, é induzida pelo sideróforo.

O efeito do pseudobactin sobre o crescimento de batata e colonização do rizoplano por fungos foi

determinado em um ensaio em casa de vegetação. Tanto o isolado B-10, como uma suspensão de células, quanto o pseudobactin a 10 uM, causaram aumentos significativos no crescimento das plantas quando comparados ao controle tratado com água. Nem o pseudobactin férrico a 50 uM, nem o isolado B-10 com 50 uM FeEDTA aumentaram o crescimento da planta. A população de fungos no rizoplano foi reduzida significativamente nas plantas tratadas com o isolado B-10 (2,3 ufc/10 cm de raiz; -59%) e pseudobactin (1,4 ufc/10 cm de raiz; -74%) quando comparada com aquelas tratadas com água (5,5 ufc/10 cm de raiz) (KLOEPPER **et alii**, 1980b). Em adição, certos mutantes não flourescentes, derivados de isolados benéficos, não produziram sideróforos, não exibiram atividade bacteriostática à **E. carotovora** e não promoveram o crescimento de batata, apesar de colonizarem as raizes das plantas.

Em 1981, TEINTZE **et alii** comprovaram que não apenas a inoculação com **Pseudomonas** B-10, mas também a aplicação do agente fluorescente transportador de ferro (sideróforo), denominado pseudobactin, promoviam o crescimento das plantas; sugeriram, então, a aplicação direta sobre o solo dos sideróforos produzidos pelas bactérias.

Esses resultados indicam, fortemente, que os RPCPs aumentam o crescimento das plantas pela produção de sideróforos, os quais sequestram eficientemente

o ferro (III) da rizosfera tornando-o indisponível para certos microrganismos rizosféricos, tais como os microrganismos deletérios às plantas.

Segundo MISAGHI **et alii** (1982), pigmentos fluorescentes solúveis em água, produzidos por 156 isolados de **Pseudomonas** patogênicas e saprófitas, inibiram o crescimento de **Geotrichum candidum.** As colônias de outros fungos como **Rhizoctonia solani, Selerotinia sclerotiorum, Phymatotrichum omnivorum, Phytophtora megasperma** e **Pythium aphanidermatum** demonstraram sensibilidade aos pigmentos produzidos por quatro isolados de **Pseudomonas** sp.. Esses pigmentos exibiram propriedades similares aos quelatos de ferro microbianos.

Esses achados têm levado a investigações do papel das **Pseudomonas** e seus sideróforos nos solos supressivos. Os solos supressivos têm alta população de **Pseudomonas,** sendo sua antibiose maior do que a encontrada em solo condutivo (COOK & ROVIRA, 1976; SMILEY, 1978).

A supressão natural desses solos pode ser causada, em parte, pela diminuição de ferro como resultado da produção de sideróforos por RPCP e outros microrganismos. A adição de FeEDTA a esses solos deveria convertê-los ao estado condutivo.

A possibilidade de conversão de um solo condutivo em um solo supressivo a patógeno se dá pela adição ao solo condutivo do isolado B-10 (uma espécie de

Pseudomonas isolada de um solo supressivo à podridão do pé), ou seu sideróforo (pseudobactin). A inoculação de sementes de linho com uma suspensão do isolado B-10 (10^9 ufc/ml) seguida pelo plantio em um solo condutivo infestado com **F. oxysporum** f. sp. **lini**, aumentou a sobrevivência das plântulas de 48% para 87%, quando comparada a plântulas não inoculadas. Segundo KLOEPPER **et alii** (1980a), o isolado B-10 colonizou abundantemente o sistema radicular do linho inoculado, com nível médio de $2,1 \times 10^3$ ufc/cm de raiz. Em um segundo ensaio, mergulhando as plântulas transplantadas de linho em uma suspensão do isolado B-10, houve um aumento da sobrevivência de linho de 45 a 83%, em solo condutivo infestado com **Fusarium**. A inoculação de sementes de cevada com o isolado B-10 (10^9 ufc/ml), antes do plantio, em um solo condutivo infestado com **G. graminis** var. **tritici**, aumentou a sobrevivência das plântulas de 27 a 88%, quando comparado a plântulas não inoculadas (KLOEPPER **et alii**, 1980 a).

Resultados similares foram obtidos quando solos condutivos infestados com patógeno da podridão do pé, foram complementados com 10^5 ufc do isolado B-10 por grama de solo, imediatamente antes da semeadura de cevada não inoculada. Quando FeEDTA e o isolado B-10 foram utilizados em conjunto, como tratamento em solo condutivo infestado com o respectivo patógeno, o solo permaneceu condutivo durante todo o ensaio (KLOEPPER **et alii**, 1980a). Segundo os mesmos

autores, a adição de pseudobactin purificado do isolado B-10, em solo condutivo infestado com o patógeno, tornou esse solo supressivo à podridão do pé e à murcha.

KLOEPPER **et alii** (1980a) demonstraram também que no ensaio da podridão do pé, o tratamento da semente com pseudobactin a 50 uM causou supressão (73% de plântulas sobreviventes) no solo condutivo, enquanto o pseudobactin a 10 uM não teve efeito significativo (13% de sobrevivência). Além disso a adição de pseudobactin férrico a 50 uM não causou supressividade nem em solo condutivo à podridão do pé, infestado com **G. graminis** var. **tritici** (20% de plântulas sobreviventes), nem em murcha de **Fusarium**, em solo condutivo infestado com **F. oxysporum** f. sp. **lini** (50% de sobrevivência).

A habilidade do isolado B-10 ou pseudobactin, em converter solos condutivos em solos supressivos, sugere que a supressão no campo está associada, em parte, aos sideróforos microbianos. Estes complexam, eficientemente, o ferro (III) já com limitado suprimento no solo, tornando-o indisponivel para o patógeno. Os dados sobre atividade fungistática, **in vitro**, de pseudobactin a **F. oxysporum** f. sp. **lini** e **G. graminis** var. **tritici** suportam esta conclusão.

Segundo SCHER & BAKER (1982), a percentagem de germinação de microconídio de **F. oxysporum** f. sp. **lini** não foi afetada pela adição de EDTA, EDDA ou DTPA (ácido dietilenodiaminotetracético), **in vitro**, porém o alongamento

do tubo germinativo foi inibido. A adição de $FeCl_3$ reverteu completamente a ação inibitória do EDDA, porém para o EDTA e DTPA a revesão foi apenas parcial.

A diminuição no teor de ferro (III) parece ajudar a explicar a supressão de **Fusarium** em linho, pepino e rabanete, como observado em trabalho publicado por SCHER & BAKER (1982), onde a adição de EDDHA (ácido etilenodiaminadi - o - hidroxifenilacético) ou de um quelato sintético de ferro (FeEDDHA) induziram a supressividade em um solo condutivo. Foi sugerido que, no caso do FeEDDHA, o ferro do complexo seria aparentemente utilizado pela planta hospedeira, liberando EDDHA, o qual induziria a supressão. No mesmo experimento, a incorporação do solo com FeEDTA eliminou a habilidade do isolado de **P. putida** A 12 em suprimir a murcha de **Fusarium**.

WONG & BAKER (1984) também induziram a supressão do patógeno da podridão do pé em trigo, com a adição de EDDHA e seu complexo férrico FeEDDHA.

Em estudos relacionados, **Pseudomonas** sp. isolado 346 suprimiu a murcha de **Fusarium** de pepino, rabanete e ervilha, causada por **F. oxysporum** f. sp. **cucumerinum**, **conglutinas** e **pisi** respectivamente (ELAD & BAKER, 1985a; ELAD & BAKER, 1985b; SNEH **et alii**, 1984). A adição de ferro (III) ao solo reduziu significativamente a habilidade do isolado 346 em limitar a germinação de **F. oxysporum** f. sp. **cucumerinum**, **lini**, **conglutinas** e **pisi** na

rizosfera de pepino, linho rabanete e ervilha respectivamente (ELAD & BAKER, 1985; SNEH **et alii**, 1984).

SNEH **et alii** em 1984, constataram que a adição de FeEDDHA, previamente descrito como indutor da supressão de Fusarium no solo, inibiu a germinação de clamidosporos na rizosfera, porém, não ocorrendo o mesmo no solo não rizosférico. Por sua vez ELAD & BAKER (1985) observaram a inibição da germinação de **Fusarium oxysporum** f. sp. **cucumerinum** no solo, por EDDHA, porém, sendo o FeEDDHA foi inefetivo. Os dois quelatos foram eficientes na inibição de **F. oxysporum** f. sp. **cucumerinum** na rizosfera de pepino, mas não inibiram a germinação de **F. solani** f. sp. **phaseoli** em rizosfera de feijão.

A disponibilidade de ferro (III) no solo declina, logaritmicamente, com o aumento do pH do solo. Assim, a supressão através de sideróforos deveria ser maior em solos alcalinos e neutros.

Os patógenos são sensíveis à ação de sideróforos por várias razões: (a) não produzem sideróforos por si próprios; (b) são incapazes de usar os sideróforos produzidos por antagonistas ou por outros microrganismos em seu ambiente; (c) produzem poucos sideróforos e/ou sideróforos com baixa afinidade por ferro, em relação aos produzidos pelos antagonistas; (d) produzem sideróforos que podem ser utilizados pelos antagonistas, mas são incapazes de utilizar aqueles produzidos pelos antagonistas (BUYER &

LEONG, 1986; LEONG, 1986; MAGAZIN **et alii**, 1986; SHER & BAKER , 1982; SCHROTH & HANCOCK, 1982).

Mutantes não produtores de sideróforos são menos supressivos a patógenos na rizosfera do que o isolado parental (KLOEPPER **et alii**, 1980a; KLOEPPER & SCHROTH , 1981; LOPER, 1988; BAKKER **et alii**, 1986; BECKER & COOK, 1988).

2.3.3.4. Producão de antibióticos

As bactérias do gênero **Pseudomonas** também produzem uma variedade de metabólitos secundários, os quais podem exibir atividade antibiótica ou fitotóxica (LEISINGER & MARGRAFF, 1979).

A maioria dos antibióticos pertence aos heterocicliclos contendo nitrogênio, tais como fenazinas e pirrolnitrina. Produzem um número raro de aminoácidos e peptideos. O papel desses e outros metabólitos secundários ainda é desconhecido.

HOWELL & STIPANOVIC (1979) isolaram de culturas de **P. fluorescens** o antibiótico pirrolnitrina, que inibiu o crescimento de **Rhizoctonia solani**, **Thielaviopsis basicola**, **Alternaria** sp. e **Verticillium dahliai** ,**in vitro**. Um aumento de 30 a 79% na sobrevivência de mudas de algodão foi observado após a inoculação das sementes com **P. fluorescens** ou pirrolnitrina. Este antibiótico não é

facilmente difusivel, sendo liberado somente devido à lise celular, e também, muito persistente no solo. Os autores postulam que a proteção a **R. solani** foi observada devido à lenta liberação de antibiótico pela morte das células.

Em trabalho relacionado, HOWELL & STIPANOVIC (1980), observaram que o isolado **P. fluorescens** Pf-5, produtor de "pyoluteorin", se mostrou eficiente contra **Pythium** spp., mas não contra **R. solani**. O "pyoluteorin" é facilmente difusivel, não persistente no solo e relativamente inativo pela adsorção às particulas de argila. No tocante ao aumento da percentagem de sobrevivência de plântulas de algodão e ao aumento do peso da planta, nos experimentos em casa de vegetação, células lavadas foram tão eficientes quanto culturas filtradas ou culturas inteiras.

Muitos destes tipos de compostos podem ser produzidos por RPCP, bem como sideróforos, e podem estar relacionados com o largo espectro de atividade antibiótica de muitos isolados, os quais incluem patógenos diferentes tais como: **E. carotovora**, **P. syringae** p.v. **tomato**; **R. solani**; **Pythium** ssp. e vários **Fusarium** spp.

Outros produtos produzidos por RPCP são bacteriocinas, as quais se mostram eficientes na inibição de outras bactérias (LOPER & SCHROTH, 1981). Estas bacteriocinas são partículas fágicas ou proteínas produzidas pelas bactérias, eficientes na inibição ou lise de outros isolados da bactéria. Apesar de seu papel como eficiente

agente do biocontrole, a adição em planta ou solo é questionável.

Em poucos casos (VIDAVER, 1976) sua produção, em um microsítio específico sobre a raiz, por RPCP, pode ser uma vantagem competitiva para o estabelecimento e manutenção de uma população. Como mencionado anteriormente, alguns isolados de RPCP ainda produzem zonas de inibição em meio rico em ferro (III), o qual suprime a elaboração de sideróforos e outros antibióticos fluorescentes. Esta zona foi eliminada pela adição de tripsina ao meio , o que explica a presença de bacteriocinas (LOPER & SCHROTH, 1981). Assim, sobre diferentes condições, um ou vários fatores antibióticos podem ser responsáveis pela observação de antibiose **in vitro**, sendo que um desses pode atuar na rizosfera no intuito de inibir outra microbiota e, indiretamente, resultar na promoção do crescimento.

Para averiguar se a produção de antibiótico estava envolvida na promoção do crecimento, KLOEPPER & SCHROTH (1981c) utilizaram mutantes negativos. Foi observado que, com plantas de batata em condições de campo, os referidos mutantes não promoveram o crescimento, porém, a colonização foi semelhante para ambos (mutante e parental). Com relação às alterações quantitativas e qualitativas na microbiota, observou-se que os tipos selvagens causaram uma redução na população de fungos e bactérias gran positivas, variando de 23 a 64% e 25 a 93% respectivamente; não ocorreu

diferença entre a população da microbiota do rizoplano de plantas controle e aquelas inoculadas com mutantes negativos, no tocante à produção de antibióticos. Outro produto é a fenazina, que é produzida por algumas **Pseudomonas** fluorescentes supressivas à podridão do pé, em trigo. Segundo WELLER & COOK (1983), o isolado de **Pseudomonas fluorescens** 2-79 inibiu **G. graminis** var. **tritici** **in vitro**, suprimindo a podridão do pé, no campo, quando aplicado como tratamento de semente.

Já foi descrito que, o mutante Tn 5 de 2-79, deficiente na produção de fenazina, foi significantemente menos supressivo à podridão do pé do que o isolado parental (cerca de 60-90% dependendo do solo utilizado). Uma complementação de mutantes deficientes em fenazina com cosmideos de 2-79 restaurou a produção de fenazina e a supressividade à podridão do pé (THOMASHOW & WELLER, 1988).

Outro composto é o Afu. Segundo JAMES & GUTTERSON (1986), a **P. fluorescens** Hv 37a produz um composto antifúngico (Afu) inibidor de **Pythium ultimum**, sendo sua síntese regulada por glicose e dependente da expressão de pelo menos 5 genes (GUTTERSON et alii, 1986; GUTTERSON et alii, 1988). HOWIE & SUSLOW (1986) descreveram um mutante isogênico de Hv 37a deficiente na produção de Afu, o qual foi significantemente menos efetivo que o isolado parental, na proteção de algodão contra **Pythium ultimum**.

A importância da produção de antibióticos no controle biológico pela bactéria **P. putida** M 17 têm sido demonstrada através de um mutante deficiente na produção de antibiótico. Esta bactéria produz um antibiótico indefinido, inibidor de **Erwinia** spp. o qual se mostrou eficiente no controle da podridão mole em tubérculos de batata; no entanto, um mutante negativo, na produção de antibiótico M 74, foi menos efetivo (COLYER & MOUNT, 1984). E descrito, também, que **P. fluorescens** R1a-80 (NRRL-B-15135) produz um antibiótico desconhecido que inibe **G. graminis** var. **tritici** **in vitro** além de nitrosoguanidina (WELLER **et alii**, 1988). HOWELL & STIPANOVIC (1979, 1980) demonstraram que os antibióticos "pyoluteorin" e pirrolnitrina purificados, obtidos de **P. fluorescens** Pf-5, promoveram a mesma proteção contra o damping-off em algodão por **Pythium ultimum** ou **R. solani**, como foi feito pela bactéria.

Em estudos onde foram utilizados mutantes, para a determinação do papel dos antibióticos ou sideróforos na supressão de doenças, a perda na capacidade de produzir tais compostos afeta pouco ou nada a habilidade da bactéria em colonizar raizes (BAKER **et alii**, 1986; KLOEPPER & SCHROTH, 1981; LOPER, 1988; WELLER **et alii**, 1988). Esses compostos não parecem afetar a fase de colonização das raizes.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Obtenção dos isolados

Um total de 69 isolados de bactérias fluorescentes foram obtidas a partir de solo rizosférico e raízes de plantas de milho em desenvolvimento, na área do campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

As plantas de milho foram coletadas em dois diferentes estádios: 15 e 30 dias após a emergência da mesma, sendo o isolamento realizado através de diluição em série do material e posterior plaqueamento em placas de Petri. Utilizou-se o meio B (KB): 20g de Proteose Peptona #3 /l, 15g de Bacto Agar /l, 10g de glicerol /l, 1,5g de K_2HPO_4 (anidro) /l, 1,5g de $MgSO_4 . 7 H_2O$ /l e pH de 7,2 (KING et alii, 1954).

Após incubação a 28 °C por 24-48h, as placas foram expostas à luz ultra-violeta e as colônias que apresentaram pigmentação verde-amarelada fluorescente foram isolados e purificados, utilizando-se meio KB.

Transferiu-se estes isolados para tubos contendo meio KB inclinado, mantidos sob refrigeração à temperatura de 4 °C.

3.2. Preparo das soluções estoque das drogas

As soluções estoque de cada substância foram preparadas conforme descrito a seguir:

- Sulfato de estreptomicina (INLAB) - 10 mg de sulfato de estreptomicina por ml de água destilada.
- Rifampicina (RIFALDIN - Lepetit S/A) - (10mg/ml)- O conteúdo de uma cápsula (300 mg) solubilizado previamente em 3 ml de álcool metílico. A este volume adicionou-se quantidade suficiente de água destilada perfazendo um total de 30 ml de solução.
- Acido nalidíxico (WINTOMYLON - Winthrop Products) - (10mg/ml)- Triturou-se um comprimido de 500 mg, com o auxílio de uma cápsula de porcelana, solubilizando-se com 5 ml de NaOH 0,1 N. O solubilizado foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50 ml e quantidade suficiente em água destilada foi adicionada.

Após a preparação das soluções estoque de antibióticos, estas foram esterilizadas por filtração, utilizando-se filtros milipore de 0,45u (SARTORIUS MEMBRANE FILTER), e conservadas sob refrigeração à temperatura de $4^{\circ}C$.

3.3. Determinação dos níveis de resistência à estreptomicina

Os níveis de resistência natural à estreptomicina (ST) dos 69 isolados obtidos foram determinados segundo método de diluição em placas, utilizando-se concentrações crescentes da droga: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 500 e 1000 ug/ml de meio KB. Para a obtenção das concentrações desejadas, em termos de ug de estreptomicina por ml de meio de cultura, foram feitas diluições a partir das soluções estoque, adicionando-se a 20 ml de meio de cultura o volume desejado da solução estoque de estreptomicina.

A adição da droga ao meio de cultura deu-se após autoclavagem, quando o meio se encontrava a uma temperatura em torno de 45 °C.

Os isolados foram repicados em placas contendo meio KB isento de qualquer antibiótico. Após 24h de incubação transferiram-se as culturas para placas contendo as diferentes concentrações de estreptomicina, utilizando-se para tal um replicador multialça. As placas foram incubadas a 28 °C e as leituras feitas após um período de 24, 48 e 72h. O crescimento das colônias (17 por placa) pode ser comparado ao de uma placa controle isenta de antibiótico.

Foi considerado, como nível de resistência, a concentração imediatamente inferior àquela que impediu o

crescimento da cultura.

3.4. Marcação genética dos isolados através de resistência a antibióticos

Nesta etapa obtiveram-se mutantes naturais, duplos e triplos, resistentes à rifampicina e ácido nalidíxico (RIF-NAL); à rifampicina e estreptomicina (RIF-ST); e à rifampicina, ácido nalidíxico e estreptomicina (RIF-NAL-ST).

Para se obter mutantes resistentes à rifampicina, o ponto de partida foi preparar uma suspensão bacteriana concentrada, em 10 ml de água destilada esterilizada, da qual uma alíquota de 0,1 ml foi distribuída em placa de Petri.

O meio utilizado foi o Nutriente Agar-NA (5g de peptona/l, 3g de extrato de carne/l, 12g de Bacto Agar/l, acrescido de 100 ug/ml de rifampicina (RIF). Após 48-72h de incubação a 28 °C, selecionou-se de cada isolado apenas uma colônia resistente à rifampicina, com tamanho similar ao das colônias não marcadas. Esta colônia foi transferida para meio KB contendo 100 ug/ml de rifampicina, no intuito de confirmação da resistência e observação da formação de pigmento fluorescente.

Em seguida, as colônias de mutantes resistentes à rifampicina foram plaqueadas em meio NA

contendo 100 ug/ml de ácido nalidíxico (NAL) e meio NA contendo 100 ug/ml de estreptomicina (ST). Após o período de incubação, procedeu-se da mesma forma adotada para obtenção de colônias resistentes à rifampicina. A purificação foi realizada em meio KB contendo 100 ug/ml de rifampicina e ácido nalidíxico para os mutantes RIF-NAL e meio KB contendo 100 ug/ml de rifampicina e estreptomicina para os mutantes RIF-ST.

Para obtenção de tripla resistência, os mutantes RIF-NAL foram plaqueados em meio NA com 100 ug/ml de estreptomicina. Após o período de incubação, seguindo-se o mesmo procedimento, as colônias resistentes foram purificadas em meio KB contendo 100 ug/ml de cada antibiótico, obtendo-se assim os mutantes RIF-NAL-ST.

3.5. Planta

Foram utilizadas plantas de milho, variedade Ag-401, isentas de tratamento químico, gentilmente cedidas pela AGROCERES.

3.6. Solos

Foram utilizadas amostras de Areias Quartzosas (AQ), Série Ribeirão Claro, em condição natural (RC NAT) e de Terra Roxa Extruturada (TE), Série Luiz de

Queiroz, em condições natural (LQ NAT) e esterilizado (LQ EST), coletadas de uma área tradicionalmente cultivada com milho. Procedeu-se a esterilização por autoclavagem a 121 °C, por um período de duas horas.

As propiedades químicas dos solos utilizados nos diferentes experimentos são apresentadas na Tabela 1.

3.7. Inoculação das sementes

As sementes de milho foram desinfestadas superficialmente através da agitação em uma solução 2,5% de hipoclorito de sódio por 10 min. e lavadas três vezes com água destilada esterilizada.

Os inóculos bacterianos utilizados consistiram de suspensões com aproximadamente 10^9 ufc/ml, ajustadas por turbidimetria, obtidas através da centrifugação de 50 ml de meio KB líquido, incubados por 24-48h e resuspendidos em $MgSO_4$ 0,1M.

A inoculação foi realizada imergindo-se as sementes nas suspensões bacterianas por um período de uma hora, sendo que as sementes do controle foram imersas em solução de $MgSO_4$ 0,1M pelo mesmo período de tempo.

Tabela 01 - Propiedades quimicas dos solos utilizados nos experimentos.

SERIE	TIPO	CLASSE TEXTURAL	ESTADO	pH CaCl2	M.O. %	P resina ug/cm³	K^{+}	Ca^{+2}	Mg^{+2}	$H+Al^{+3}$
							emg (100 cm³)			
			NATURAL	4.3	2.6	4	0.1	0.65	0.31	3.1
Ribeirão Claro	Areias Quartzosas	Areia Fina								
			ESTERILIZADO	4.2	2.6	3	0.09	0.69	0.29	3.1
			NATURAL	5.2	3.3	119	0.58	8.47	2.68	2.0
Luiz de Queiroz	Terra Roxa Estruturada	Argila								
			ESTERILIZADO	5.7	3.7	81	0.58	8.22	2.79	1.8

Continuação Tabela 01

	S	T	V%	Cu	Fe	Mn	Zn
	emg (100 cm³)			ug.g^{-1}			
NATURAL	1.06	4.16	25	0.49	29.9	1.04	1.04
Ribeirão Claro							
ESTERILIZADO	1.07	4.17	26	1.81	88.4	3.62	1.06
NATURAL	11.73	14.53	81	3.82	4.86	94.4	3.14
Luiz de Queiroz							
ESTERILIZADO	11.59	13.39	87	2.19	0.96	503.4	2.97

3.8. Avaliação da ocorrência natural de resistência aos antibióticos utilizados como marcadores

Foram preparados dois vasos utilizando-se em um deles 2,5 kg de amostra de solo da Série Luiz de Queiroz, do qual foram coletadas as plantas utilizadas para obtenção dos isolados, e no outro, a mesma quantidade de amostra do solo da Série Ribeirão Claro.

Em cada vaso semearam-se duas sementes de milho e, após a emergência das plântulas, procedeu-se um desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso.

A colheita foi realizada 15 dias após o plantio das sementes, sendo as plantas removidas cuidadosamente eas suas raizes pesadas e homogeneizadas por 20 segundos, com o uso de um Vortex, em 9 ml de $MgSO_4$ 0,1M.

As suspensões foram plaqueadas em meio KB contendo diferentes antibióticos: 100 ug/ml de rifampicina e ácido nalidixico; 100 ug/ml de rifampicina e estreptomicina; 100 ug/ml de rifampicina, ácido nalidixico e estreptomicina. Utilizou-se como controle o plaqueamento em meio KB isento de antibiótico.

Posteriormente ao periodo de incubação de 24-48h, realizou-se a avaliação do número de ufc/g de raiz.

3.9. Avaliação da capacidade de colonização dos mutantes em condições gnotobióticas

Como substrato, utilizaram-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais. Para tanto, procedeu-se apenas uma adubação equivalente a 500kg/ha da fórmula 4-14-8, por ser esta prática comumente utilizada na área de plantio na qual o solo foi coletado.

As sementes, previamente inoculadas, foram postas em tubos de vidro (uma semente para cada tubo), com dimensões de 25 x 300 mm, contendo 8 cm (62g) de solo natural e 9 ml de água destilada. A seguir, foram adicionados mais 2 cm (15g) de solo e 2 ml de água destilada, os tubos foram selados com filme de polietileno e incubados em câmara de crescimento, com ciclo de 16 horas de luz / 8 horas de escuro e temperatura controlada em 25 +/- 1 °C, pelo período de uma semana.

A umidade do solo utilizada correspondeu a 70% da capacidade de retenção de água (U=20,2%).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos (12 mutantes e 1 controle) e três repetições.

Após o período de incubação, as plantas foram cuidadosamente removidas dos tubos, o sistema radicular separado da parte aérea na altura do colo da planta, pesado, imerso em 9 ml de $MgSO_4$ 0,1M e homogeneizado com

agitação em Vortex por 20 segundos.

As suspensões foram, então, plaqueadas em meio KB contendo 100 ug/ml de rifampicina e ácido nalidíxico para os mutantes RIF-NAL; 100 ug/ml de rifampicina e estreptomicina para os mutantes RIF-ST e 100 ug/ml de rifampicina, ácido nalidíxico e estreptomicina para os mutantes RIF-NAL-ST.

Após a incubação por 24-48h procedeu-se à avaliação do número de ufc/g de raiz.

3.10. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento pelos mutantes RIF-NAL em casa de vegetação - EXPERIMENTO 1

Utilizaram-se amostras do solo pertencente à Série Ribeirão Claro, procedendo-se a uma adubação, equivalente a 500kg/ha da fórmula 4-14-8. Copos plásticos de 500 ml foram utilizados como vasos, contendo 500g de terra, a qual foi mantida com umidade de aproximadamente 70% de sua capacidade de retenção de água (U=16%).

Foram semeadas duas sementes por vaso, sendo que após a emergência das plântulas foi realizado um desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 70 tratamentos (69 mutantes e 1 controle), com 5 repetições.

Procedeu-se à colheita 20 dias após a semeadura.

3.11. Avaliação da capacidade de promoção da emergência e do crescimento das plântulas em casa de vegetação - EXPERIMENTO 2

Os isolados utilizados neste experimento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização e procedência dos isolados utilizados no EXPERIMENTO 2.

ISOLADO	PROCEDENCIA
39RN	-
41RN	-
42RN	-
52RN	-
136RN	-
148RN	-
W4F35 - Pseudomonas fluorescens	D.C.GROSS [a]
W4F58 - Pseudomonas fluorescens	D.C.GROSS
W4F68 - Pseudomonas fluorescens	D.C.GROSS
W4F111- Pseudomonas fluorescens	D.C.GROSS
W4F164- Pseudomonas fluorescens	D.C.GROSS
W4P5 - Pseudomonas putida	D.C.GROSS
W4P63 - Pseudomonas putida	D.C.GROSS
W4P144- Pseudomonas putida	D.C.GROSS
2-79 - Pseudomonas fluorescens	D.M.WELLER [b]

a - Washington State University
b - United States Department of Agriculture

Neste experimento utilizaram-se amostras do solo da Série Luiz de Queiroz, em condição natural e esterilizada, com uma adubação equivalente a 500kg/ha da fórmula 4-14-8. Copos plásticos de 500 ml foram utilizados como vasos, contendo 500g de terra, a qual foi mantida com umidade de aproximadamente 70% de sua capacidade de retenção de água (U=20,2%).

Semearam-se cinco sementes por vaso a fim de se avaliar a capacidade de promoção de emergência das plântulas, a qual foi observada nos cinco primeiros dias. Após este período houve um desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso.

O delimeamento experimental foi inteiramente casualizado, com 16 tratamentos (15 isolados e 1 controle), com 5 repetições. Procedeu-se a colheita 20 dias após a semeadura para se avaliar a capacidade dos isolados em promover o crescimento das plantas.

3.12. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento em casa de vegetação - EXPERIMENTO 3

Os isolados utilizados neste experimento estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização e procedência dos isolados utilizados no EXPERIMENTO 3.

ISOLADO	PROCEDENCIA
G2-26 - Pseudomonas putida	KLOEPPER,J.W.[a]
G20-18 - Pseudomonas fluorescens	KLOEPPER,J.W.
I-102 - Serratia proteamaculans ss quinovora	KLOEPPER,J.W.

a - Allelix Inc., Canada

Foram utilizadas amostras dos solos da Série Luiz de Queiroz (Natural- LQ NAT e Esterilizado - LQ EST) e da Série Ribeirão Claro (Natural - RC NAT). Em ambos fez-se uma adubação equivalente a 500kg/ha da fórmula 4-14-8. Copos plásticos de 500ml foram utilizados como vasos, contendo 500g de terra, a qual foi mantida com umidade de aproximadamente 70% da capacidade de retenção de água (U=20,2% para o solo LQ e U=16% para o solo RC).

Semearam-se cinco sementes por vaso, sendo que, após a emergência das plântulas, houve um desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso. Realizou-se a colheita 20 dias após a semeadura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (3 isolados e 1 controle), com 5 repetições.

3.13. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento de diferentes mutantes em casa de vegetação - EXPERIMENTO 04

Utilizaram-se amostras do solo da Série Luiz de Queiroz, com uma adubação equivalente a 500kg/ha da fórmula 4-14-8. Utilizaram-se copos plásticos de 500 ml como vasos, contendo 500g de solo, o qual foi mantido com umidade de aproximadamente 70% da capacidade de retenção de água (U=20,2%).

Foram semeadas 5 sementes por vaso, sendo que após a emergência das plântulas houve um desbaste deixando-se somente três plantas por vaso.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 19 tratamentos (18 mutantes e 1 controle), e 5 repetições.

Procedeu-se a colheita 20 dias após a semeadura.

3.14. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento em diferentes épocas de colheita - EXPERIMENTO 05

Foram utilizados neste experimento os isolados 41RN e 136RN.

Amostras do solo da Série Ribeirão Claro, foi empregado em estado natural. Semeou-se cinco sementes por vaso, sendo que após a emergência das plântulas houve um desbaste deixando-se três plantas por vaso. Adicionou-se 100 ml de solução nutritiva de HOAGLAND isenta de ferro, três vezes por semana, até o final do experimento. Utilizou-se vasos de barro com capacidade de 3 kg de terra, o qual foi mantido com umidade de aproximadamente 70% da sua capacidade de retenção de água (U=16%).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (2 isolados e 1 controle), e 5 repetições .

Procedeu-se à colheita aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a semeadura.

3.15. Colheita e variáveis determinadas

Durante a colheita separou-se o sistema radicular da parte aérea da planta, sendo este lavado em água corrente. O sistema radicular e a parte aérea de cada planta foram colocados em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada, a 60 °C, até peso constante. Em seguida determinou-se a produção da matéria seca da parte aérea (MSPA), da matéria seca do sistema radicular (MSSR) e da matéria seca total (MST), com o auxílio de uma balança analítica.

3.16. Análise estatistica

Os dados experimentais obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos a uma análise de variância.

A comparação das médias, duas a duas, foi realizada pelo teste de Fisher.

Para esta análise utilizou-se do programa SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (Elio P. Zonta; Amauri A. Machado e Paulo Silveira Jr.; registro SEI - 066060, Cat. A).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinações preliminares

4.1.1. Determinação dos níveis de resistência a estreptomicina

Sabe-se que, mutantes de **Rhizobium** e **Azospirillum** resistentes à estreptomicina apresentam maior capacidade de colonizar as raízes. Supõe-se que este fato seja devido principalmente à produção de estreptomicina por actinomicetos na rizosfera de leguminosas e gramíneas. Portanto, optou-se pela introdução do referido antibiótico como marcador para os ensaios de colonização.

Com o intuito de escolher a concentração de estreptomicina ideal para a obtenção de mutantes foi realizada uma avaliação dos níveis de resistência natural, dos isolados obtidos, ao referido antibiótico.

Os dados de resistência à estreptomicina obtidos para os 69 isolados de possíveis RPCPs provenientes da rizosfera de milho, após 24, 48 e 72 horas, são apresentados nas Figuras 1, 2 e 3 respectivamente.

Podemos observar nos histogramas que, com o passar do tempo, os isolados apresentaram resistência a concentrações maiores do antibiótico, devido a própia perda de atividade deste. Porém observamos uma grande variabilidade nos resultados.

Uma vez que a maior parte dos isolados durante o período de observação apresentou resistência a concentrações menores que 100 ug/ml, esta concentração foi escolhida para a marcação genética dos isolados.

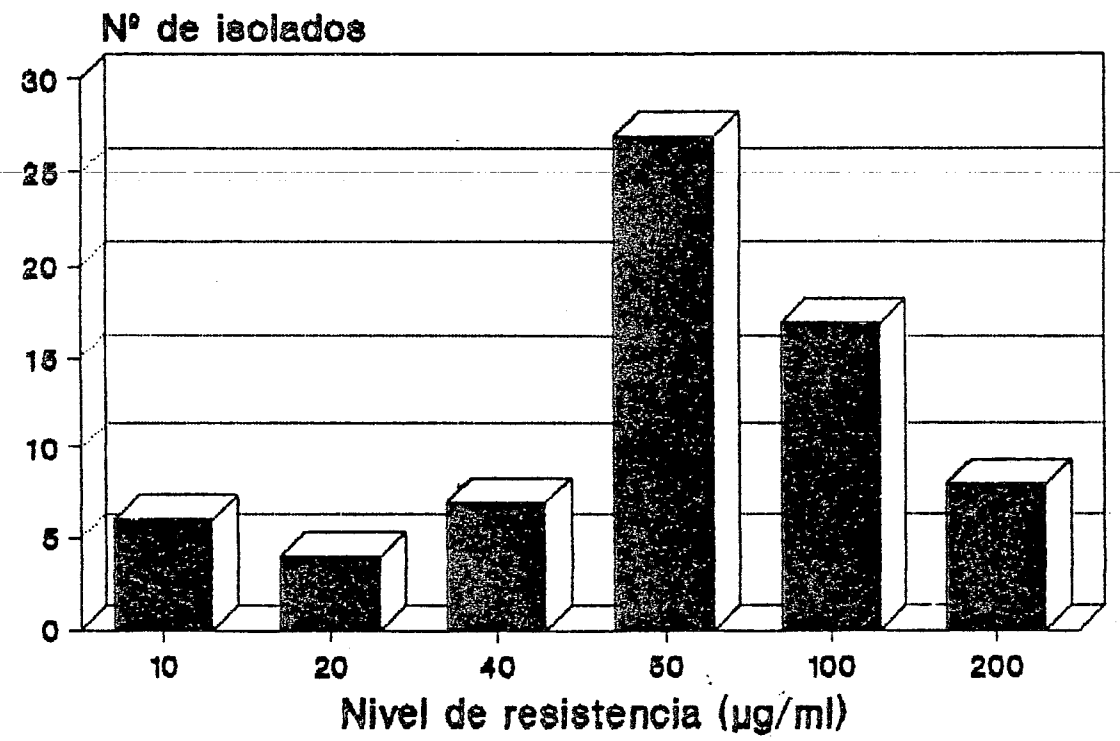


Figura 1 - Distribuição dos niveis de resistência à estreptomicina dos isolados, após 24 horas de incubação.

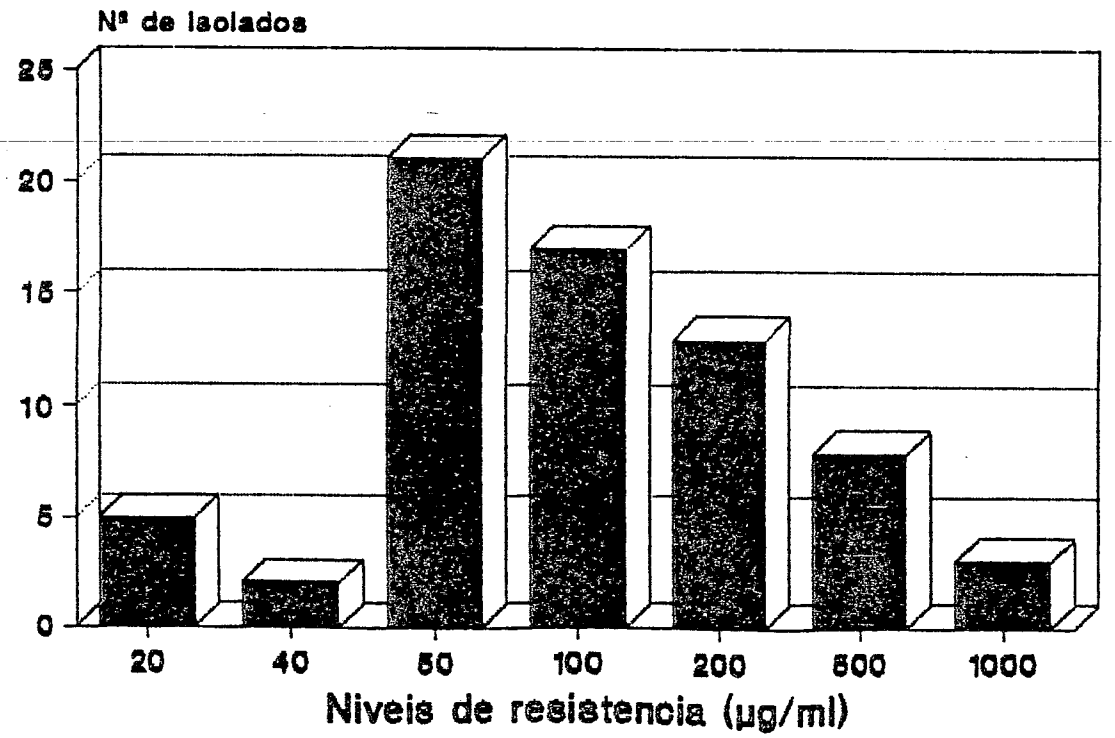


Figura 2 - Distribuição dos níveis de resistência à estreptomicina dos isolados, após 48 horas de incubação.

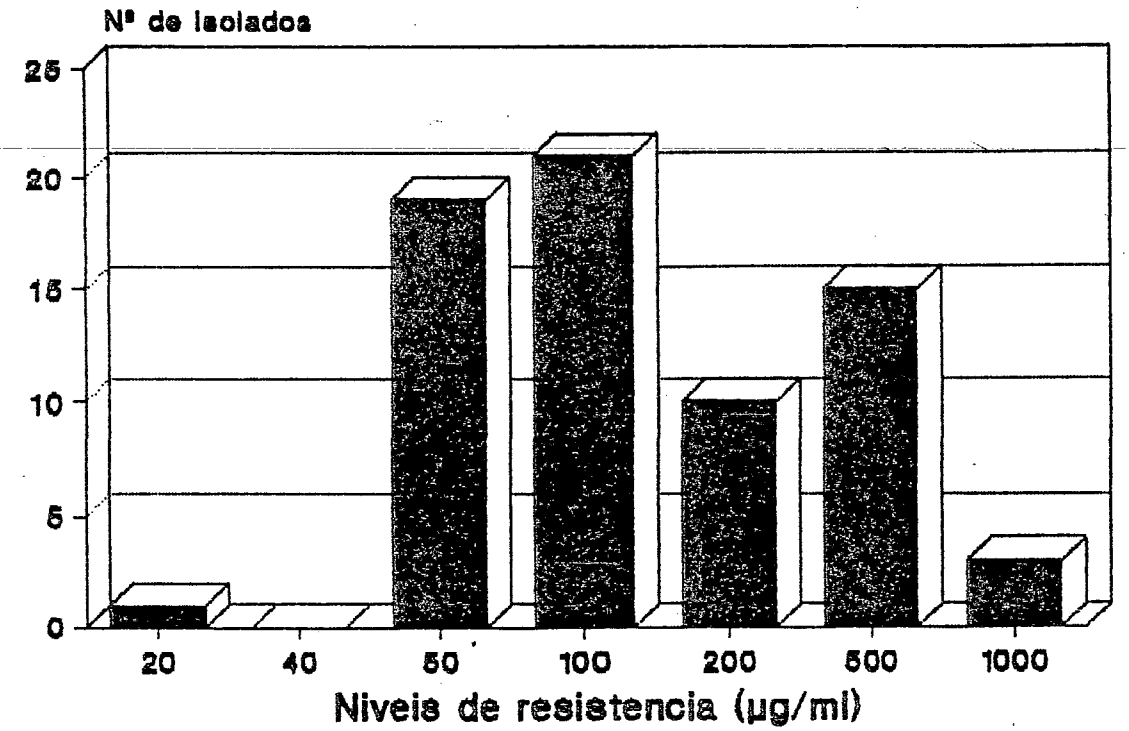


Figura 3 - Distribuição dos níveis de resistência à estreptomicina dos isolados, após 72 horas de incubação.

4.1.2. Marcação genética dos isolados através de resistência aos antibióticos

Para que possamos monitorar um isolado após sua introdução em um ecosistema complexo é necessário que este organismo possua caracteristicas de seletividade e que as mesmas não interfiram na sua habilidade de sobreviver e colonizar o sistema radicular. Para tanto, optou-se pelo método de marcação genética do isolado, através da obtenção de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos.

Foram obtidos mutantes naturais com dupla e tripla resistência, a saber: RIF-NAL (rifampicina e ácido nalidíxico), RIF-ST (rifampicina e estreptomicina) e RIF-NAL-ST (rifampicina, ácido nalidíxico e estreptomicina).

Todos os isolados apresentaram mutantes RIF-NAL, sendo que os mutantes RIF-ST foram obtidos em apenas 52 isolados, enquanto que, mutantes RIF-NAL-ST foram obtidos em 58 isolados. Em 09 isolados obtiveram-se apenas mutantes RIF-NAL e mutantes RIF-ST, não se obtendo mutantes RIF-NAL-ST. Em 15 isolados foram obtidos mutantes RIF-NAL e mutantes RIF-NAL-ST, não se obtendo mutantes RIF-ST. Dois isolados apresentaram apenas mutantes RIF-NAL.

Para melhor compreensão, estes resultados estão sendo apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Distribuição dos diferentes tipos de mutantes obtidos a partir dos 69 isolados utilizados.

Número de isolados	MUTANTES	Número de mutantes
02	RIF-NAL	02
09	RIF-NAL, RIF-ST	18
15	RIF-NAL, RIF-NAL-ST	30
43	RIF-NAL, RIF-ST, RIF-NAL-ST	129
	TOTAL	179

Tabela 5 - Total dos diferentes mutantes obtidos a partir dos 69 isolados.

MUTANTES	TOTAL
RIF-NAL	179
RIF-ST	147
RIF-NAL-ST	159

4.1.3. Avaliação da ocorrência natural de resistência aos antibióticos utilizados como marcadores

Colônias fluorescentes foram observadas apenas nas placas contendo meio KB sem antibiótico. Isto demonstra a não ocorrência de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados como marcadores, nas amostras solo pertencentes às Séries Ribeirão Claro e Luiz de Queiroz.

4.1.4. Avaliação da capacidade de colonização dos mutantes em condições controladas

Com o intuito de observar se os três diferentes mutantes apresentariam diferenças na capacidade de colonização da raiz, foram escolhidos, aleatoriamente, 4 isolados que apresentaram os três diferentes tipos de mutantes, perfazendo um total de 12 mutantes diferentes. Os resultados obtidos, referentes à colonização das raizes por diferentes mutantes, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de raiz, após uma semana da emergência das plântulas (média de 3 repetições).

ISOLADOS	MUTANTES		
	RN	RS	RNS
39	$4,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	---------
42	$1,9 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$
52	$7,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
148	$1,5 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$

Podemos observar na Tabela 6 que a colonização atigiu valores entre $10^4 - 10^6$ ufc/g de raiz não ocorrendo diferenças significativas entre os diferentes

mutantes. O tratamento controle não foi apresentado, uma vez que não se observou crescimento de nenhuma colônia fluorescente nas placas contendo os diferentes antibióticos.

Com estes resultados podemos sugerir que a introdução da estreptomicina como marcador não influenciou a capacidade de colonização dos mutantes. Desta forma escolheu-se para utilização nos experimentos seguintes apenas os mutantes marcados com resistência à rifampicina e ácido nalidíxico, amplamente utilizado por diversos autores (KLOEPPER et alii, 1980a; KLOEPPER & SCHROTH, 1981a e 1981b; SUSLOW & SCHROTH, 1982a e 1982b).

4.2. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento pelos mutantes RIF-NAL em casa de vegetação. - EXPERIMENTO 01

Observou-se o efeito de 69 mutantes RIF-NAL, na promoção do crescimento de milho, com o objetivo de realizar uma seleção prévia destes mutantes para os experimentos posteriores.

Os seis melhores mutantes, no tocante a produção de matéria seca da parte aérea (mutantes de número 136, 42, 39, 148, 41 e 52), foram selecionados para a utilização em experimentos posteriores (Tabela 7), uma vez que apresentaram produção de matéria seca total e matéria seca do sistema radicular maiores do que o controle (exceto

o mutante 39RN). Não houve efeito significativo da inoculação dos mutantes nas diferentes variáveis avaliadas.

Tabela 7 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST), comprimento do sistema radicular (CSR) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com os mutantes RN, em amostras de solo Ribeirão Claro em condições naturais (RC NAT), aos 20 dias após a semeadura (média de 5 repetições).

MUTANTES	MSPA	V.P.	MSSR	V.P.	MST	V.P.	CSR	V.P.
	g	%	g	%	g	%	cm	%
136RN	0,84	23,5	0,68	6,2	1,52	15,1	28,80	-11,1
42RN	0,74	8,8	0,66	3,1	1,40	6,0	33,90	4,6
39RN	0,74	8,8	0,60	-6,2	1,34	1,5	35,40	9,3
148RN	0,74	8,8	0,66	3,1	1,40	6,0	29,20	-9,9
41RN	0,74	8,8	0,70	9,4	1,44	9,1	28,00	-13,5
52RN	0,72	5,8	0,68	6,2	1,40	6,0	29,80	-8,0
CONTROLE	0,68	---	0,64	---	1,31	---	32,40	----

4.3. Avaliação da capacidade de promoção da emergência e do crescimento das plântulas em casa de vegetação. - EXPERIMENTO 2

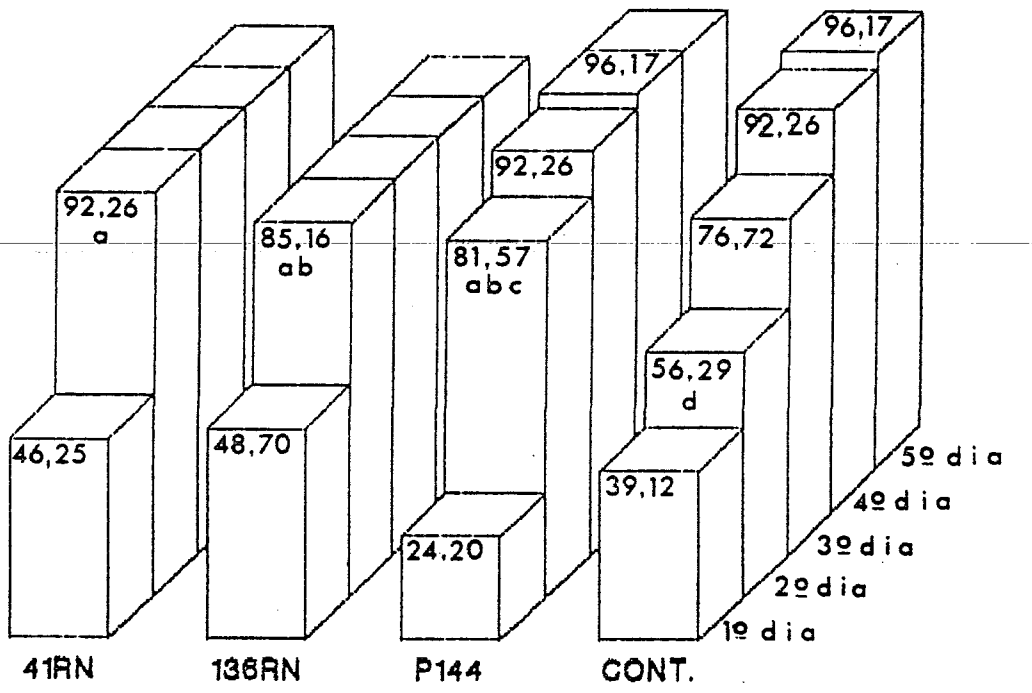
Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de promoção da emergência e do crescimento dos seis isolados previamente selecionados, em condições de solo natural e esterilizado. Contactou-se alguns pesquisadores com o intuito de se obter alguns isolados de RPCP, para efeito de comparação em nossos experimentos. Desta forma, obteve-se do Dr. GROSS, do Departamento de Patologia Vegetal da Universidade de Washington, um total de 8 isolados (5 isolados de **P. fluorescens** e 3 isolados de **P. putida**). Essas bactérias foram isoladas de tubérculos e rizosfera de batata e foram selecionadas através de propriedades antagônicas a **Erwinia carotovora** subsp. **atroseptica** (XU & GROSS, 1981a). Empregou-se ainda o isolado de **P. fluorescens** 2-79 (NRRL-B-15132), enviado pelo Dr. WELLER do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o qual foi isolado de raizes de trigo em desenvolvimento em um solo naturalmente supressivo à podridão do pé provocado por **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici** e que apresentava antagonismo **in vitro** (WELLER & COOK, 1983).

4.3.1. Promoção da emergência de plântulas

Recentemente, KLOEPPER et alii (1986) observaram que bactérias da rizosfera, as quais metabolizavam ativamente os exudados das sementes a baixas temperaturas, podiam aumentar a emergência de plântulas em condições de campo. Desta forma, este experimento teve por objetivo avaliar o efeito dos isolados sobre a percentagem de emergência das plântulas durante um período de 5 dias após a semeadura.

Os dados obtidos foram transformados em $x^{3/2}$ (x é a percentagem de emergência) e a análise estatística foi realizada para verificar o efeito dos isolados para cada dia de observação e em cada condição de solo (natural e esterilizado).

Para as amostras esterilizadas, não ocorreram diferenças na percentagem de emergência de plântulas durante os cinco dias de observação. Porém nas amostras de solo naturais (Figura 4) foram observadas diferenças signifivativas apenas no segundo dia de observação após a semeadura, sendo os isolados 41RN, 136RN e P144 superiores ao controle, no nível de 5% de probabilidade.



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Figura 4 -Efeito da inoculação dos isolados 41RN, 136RN e P144 sobre a emergência de plântulas de milho em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT), obsevada durante 5 dias após a semeadura (média de 5 repetições).

É importante salientar que as sementes inoculadas com os isolados 41RN e 136RN atingiram o potencial máximo de emergência das plântulas no segundo dia após a semeadura, enquanto que, para as sementes controle, esse potencial foi atingido apenas no quinto dia de observação.

É geralmente aceito que a promoção do crescimento das plantas, induzida por **Pseudomonas**, ocorre como resultado da supressão da microbiota deletéria nativa da rizosfera, não sendo observada em condições de solo esterilizado (SUSLOW, 1982). Entretanto, recentemente, LIFSHITZ **et alii** (1987) observaram que alguns isolados de RPCP promoveram o crescimento de plantas na ausência de microrganismos deletérios, ou seja, a inoculação de sementes de colza com o isolado de **P. putida** (GR 12-2) induziu, significativamente, aumentos no comprimento da raiz, peso seco do sistema radicular e altura da parte aérea, em condições gnotobióticas.

4.3.2. Promoção do crescimento

Optou-se por realizar neste experimento uma análise estatistica para cada condição de solo, ou seja, solo da Série Luiz de Queiroz natural - LQ NAT e esterilizado LQ EST.

Os valores de F e os coeficientes de variação para as variáveis analisadas, nas diferentes condições de solo, estão apresentados na Tabela 8, onde podemos observar a existência de efeito significativo dos tratamentos em todas as variáveis em análise.

Tabela 8 - Valores de F e coeficientes de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais e esterilizadas. - EXPERIMENTO 2

SOLOS[1]		MSPA	MSSR	MST
LQ NAT	F[2]	4,9675 ***	1,6808 *	1,6364 *
	C.V.(%)	17,92	17,09	14,91
LQ EST	F	2,3243 **	31,6154 ***	3,8446 ***
	C.V.(%)	18,45	28,47	19,30

[1] -Condição do solo LQ NAT - solo da série Luiz de Queiroz Natural
LQ EST - solo da série Luiz de Queiroz Esterilizado

[2] * - significância a 10% de probabilidade
** - significância a 5% de probabilidade
*** - significância a 1% de probabilidade

A produção de matéria seca da parte aérea, matéria seca do sistema radicular e matéria seca total, bem como a variação percentual em relação ao controle, em amostras de solo Luiz de Queiroz em condições naturais estão apresentadas nas Tabelas 9, 10, e 11 respectivamente.

Tabela 9 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual(V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MSPA(g)	V.P.(%)
39RN	0,3682 a	0,97
CONTROLE	0,3646 a	-----
148RN	0,3532 a	-3,13
F35	0,3511 ab	-3,70
F144	0,3407 abc	-6,55
2-79	0,3371 abcd	-7,54
52RN	0,3359 abcd	-7,87
136RN	0,3338 abcd	-8,45
41RN	0,3155 bcd	-13,46
42RN	0,3084 cde	-15,41
F5	0,3081 cde	-15,49
F164	0,3060 cde	-16,07
F111	0,3026 de	-17,00
F58	0,2906 ef	-20,29
F68	0,2890 ef	-20,73
F63	0,2662 f	-26,99

d.m.s. 5% = 0,0372

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% pelo teste de Fisher.

Podemos observar que a introdução de alguns isolados causou decréscimo na produção de matéria seca das plantas de milho, enquanto outros isolados não alteraram significativamente o resultado.

Tabela 10 - Matéria seca do sistema radicular (MSSR) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MSSR(g)	V.P.(%)
F68	0,4701 a	0.06
F144	0,4699 a	0,02
CONTROLE	0,4698 a	----
F35	0,4645 ab	-1,13
41RN	0,4638 ab	-1,28
52RN	0,4527 ab	-7,54
39RN	0,4469 ab	-4,87
2-79	0,4395 ab	-6,45
136RN	0,4346 abc	-7,49
148RN	0,4191 abc	-10,79
F58	0,4175 abc	-11,13
F63	0,3993 abc	-15,00
P5	0,3900 abc	-16,98
F164	0,3825 bc	-18,58
42RN	0,3597 c	-23,43
F111	0,3533 c	-24,80
d.m.s. 5% = 0,0867		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nivel de 5% pelo teste de Fisher.

Tabela 11 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz em condições naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MST(g)	V.P.(%)
CONTROLE	0,8345 a	----
F35	0,8156 ab	-1,00
39RN	0,8151 ab	-2,32
P144	0,8106 ab	-2,86
52RN	0,7893 abc	-5,42
41RN	0,7793 abcd	-6,61
2-79	0,7767 abcd	-6,70
148RN	0,7723 abcd	-7,45
136RN	0,7685 abcd	-7,91
F68	0,7591 abcd	-9,03
F58	0,7081 abcd	-15,15
P5	0,6981 bcd	-16,34
F164	0,6885 bcd	-17,49
42RN	0,6682 cd	-19,93
P63	0,6655 cd	-20,25
F111	0,6559 d	-21,40

d.m.s. 5% = 0,0867

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% pelo teste de Fisher.

Nas Tabelas 12, 13 e 14 estão apresentadas respectivamente a produção de matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e total, bem como a variação em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes

isolados e cultivadas em solo da série Luiz de Queiroz esterilizado.

Tabela 12 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual(V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST) (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MSPA(g)	V.P.(%)
F68	0,4307 a	22,15
F111	0,4300 a	21,95
42RN	0,4288 ab	21,61
P5	0,4030 abc	14,29
F164	0,3912 abcd	10,95
148RN	0,3787 abcd	7,40
41RN	0,3726 abcd	5,67
P144	0,3722 abcd	5,56
136RN	0,3648 abcd	3,46
CONTROLE	0,3526 bcde	----
52RN	0,3509 cde	-0,48
39RN	0,3420 cde	-3,01
P63	0,3322 cde	-5,78
2-79	0,3298 cde	-6,46
F58	0,3260 de	-7,54
F35	0,2856 e	-19,00

d.m.s. 5% = 0,0769

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5%, pelo teste de Fisher.

Para a variável matéria seca da parte aérea (Tabela 12) apenas os isolados F68 e F111 promoveram o crescimento de forma significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Matéria seca do sistema radicular (MSSR) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST) (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MSSR(g)	V.P.(%)
136RN	0,5312 a	29,37
41RN	0,5268 a	28,30
148RN	0,5178 a	26,11
42RN	0,5140 a	25,18
39RN	0,5036 a	22,65
52RN	0,4514 b	9,94
P5	0,4503 b	9,67
F58	0,4234 b	3,12
CONTROLE	0,4106 bc	----
F111	0,4084 bc	-0,54
2-79	0,3661 cd	-10,84
P144	0,3239 d	-21,11
F68	0,3188 d	-22,36
F35	0,3162 d	-22,99
F164	0,2915 df	-29,00
P63	0,2689 f	-34,51
d.m.s. 5% = 0,0456		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5%, pelo teste de Fisher.

Para a variável matéria seca do sistema radicular, pode-se observar na Tabela 13 que apenas os isolados selecionados no Experimento I promoveram o crescimento de forma significativa. Assim, os isolados 136RN, 41RN, 148RN, 42RN e 39RN apresentaram aumentos entre 22,65 e 29,37%, enquanto que os isolados P144, F68, F35, F164 e F63 promoveram decréscimos significativos na produção de matéria seca do sistema radicular, proporcionando variações de -34,51 a -21,11%.

Para a variável matéria seca total (Tabela 14) podemos observar que apenas o isolado 42RN apresentou diferenças significativa em relação ao controle, causando um incremento de 23,53%, enquanto que os isolados F164, F35 e P63 foram significativamente inferiores ao controle, com decréscimos de -21,23 a -10,55%.

E interessante notar que, para as variáveis matéria seca do sistema radicular e matéria seca total, todos os isolados selecionados no presente trabalho foram superiores ao controle.

Tabela 14 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, utilizando-se amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizadas (LQ EST (média de 5 repetições).

ISOLADOS	MSPA(g)	V.P.(%)
42RN	0,9428 a	23,53
41RN	0,8995 ab	17,86
148RN	0,8965 ab	17,46
136RN	0,8960 ab	17,40
P5	0,8537 ab	11,86
39RN	0,8456 abc	10,80
F111	0,8384 abc	9,85
52RN	0,8023 abc	5,12
CONTROLE	0,7632 bc	----
F68	0,7495 bcd	-1,79
F58	0,7494 bcd	-1,81
F144	0,6992 cd	-8,78
2-79	0,6960 cd	-8,80
F164	0,6827 d	-10,55
F35	0,6018 d	-21,15
P63	0,6012 d	-21,23

d.m.s. 5% = 0,1538

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5%, pelo teste de Fisher.

Os resultados obtidos neste experimento concordam com os apresentados por LIFSHITZ **et alii** (1987), uma vez que foi observada promoção do crescimento em condições de solo esterilizado. Uma possível explicação para tal resultado seria a concentração de ferro no solo LQ EST em relação ao LQ NAT o que poderia estar relacionado à produção de sideróforos por alguns dos isolados avaliados. FREITAS (1989), por sua vez, também observou a estimulação do desenvolvimento da plântulas de café com a introdução de isolados de **Pseudomonas** sp. em areia esterilizada.

E interessante notar que o solo Luiz de Queiroz, por apresentar adequado nível de fertilidade e teor de matéria orgânica (Tabela 1) deve conter uma população microbiana mais ativa e diversificada, podendo esta ter influenciado, de forma negativa, o estabelecimento da bactéria introduzida. Provavelmente esta apresentava um potencial de inóculo insuficiente ou, talvez, as condições ambientais não lhe eram favoráveis.

Por outro lado, nesta discussão sobre a influência da população microbiana nativa do solo, sugere-se que tenha ocorrido uma possível competição da bactéria introduzida com a população de organismos deletérios do solo, o que, portanto, causou aumento na capacidade de emergência das plântulas, sem, entretanto, haver promoção do crescimento.

4.4. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento, em casa de vegetação - EXPERIMENTO 3

Com o objetivo de avaliar a capacidade de promoção do crescimento de mais três isolados de RPCP, enviados pelo Dr. KLOEPPER da ALLELIX INC., Canada, realizou-se o EXPERIMENTO 3, uma vez que os mesmos não chegaram a tempo de serem incluidos no EXPERIMENTO 2.

Segundo KLOEPPER (1987) essas bactérias foram isoladas de raízes de soja (I-102), raízes de gramíneas nativas (G20-18) e raízes de uma saxifragácea nativa (G2-26).

Neste experimento optou-se por realizar uma análise estatística para cada condição de solo, ou seja, amostras de solo da Série Ribeirão Claro natural - RC NAT, Série Luiz de Queiroz natural - LQ NAT e esterilizado - LQ EST.

Os valores de F e os coeficientes de variação para as variáveis analisadas, nas diferentes condições de solo, estão apresentados na Tabela 15, onde podem ser observados efeitos significativos apenas na variável matéria seca da parte aérea (MSPA), nas amostras do solo RC NAT e

---

KLOEPPER,J.W. (Allelix Inc., Ontario, Canada) Comunicação pessoal, 1987.

matéria seca do sistema radicular, nas amostras do solo LQ NAT.

Observa-se que, para as amostras de solo RC NAT (Tabela 16), de uma forma geral, ocorreram incrementos na produção de matéria seca para as três variáveis observadas, sendo que, para a produção de matéria seca da parte aérea, apenas o isolado I-102, com 22,02% de incremento, apresentou-se estatisticamente diferente do controle a 10% de probabilidade. O isolado G2-26 apresentou diferenças significativas, em relação ao controle, na produção de matéria seca do sistema radicular (23,47%) e matéria seca total (19,47%).

Nas amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (Tabela 17) e esterilizadas (Tabela 18) a introdução dos isolados promoveu, de uma maneira geral, um decréscimo na produção de matéria seca das diferentes variáveis analisadas. Significativamente ocorreram diferenças para o isolado G2-26, na produção de matéria seca do sistema radicular e total, nas amostras de solo LQ NAT, e para matéria seca da parte aérea e total, nas amostras de solo LQ EST. Por sua vez o isolado G20-18 apresentou diferenças significativas para a produção de matéria seca do sistema radicular, nas amostras de solo LQ NAT e matéria seca total, nas amostras de solo LQ EST.

Tabela 15 - Valores de F e coeficientes de variação (C.V.) obtidos através da análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, nos três tipos de amostras de solo utilizadas.

SOLOS[1]		MSPA	MSSR	MST
RC NAT	F[2]	2,6307 *	1,6864	1,4653
	C.V.(%)	15,57	16,09	14,38
LQ NAT	F	0,9833	3,9192 **	2,0297
	C.V.(%)	18,45	28,47	19,30
LQ EST	F	1,6317	1,3061	1,9752
	C.V.(%)	14,72	30,67	20,48

1-Solos: RC NAT - solo da Série Ribeirão Claro natural

LQ NAT - solo da Série Luiz de Queiroz natural

LQ EST - solo da Série Luiz de Queiroz esterilizado

2- * - significância a 10% de probabilidade
** - significância a 5% de probabilidade

Tabela 16 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro Naturais (RC NAT). (média 5 repetições).

ISOLADO	MSPA(g)	V.P.(%)	MSSR(g)	V.P.(%)	MST(g)	V.P.(%)
I-102	1,0667a	22,02	1,0678ab	8,31	2,1345ab	14,75
G2-26	1,0049ab	14,95	1,2173a	23,47	2,2222a	19,47
G20-18	0,8758 b	0,18	1,1640ab	18,06	2,0398ab	9,66
CONTROLE	0,8742 b	-----	0,9859 b	-----	1,8601 b	-----
dms 10%	0,1465		0,1952		0,3164	

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si no nivel de 10% , pelo teste de Fisher.

Tabela 17 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.), em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média 5 repetições).

ISOLADO	MSPA(g)	V.P.(%)	MSSR(g)	V.P.(%)	MST(g)	V.P.(%)
I-102	1,6095	11,42	1,4396ab	-6,13	3,0491a	2,38
G2-26	1,4009	-3,02	1,2076c	-21,26	2,6085c	-12,41
G20-18	1,4592	1,02	1,2597bc	-17,86	2,7189abc	-8,71
CONTROLE	1,4445	-----	1,5337a	-----	2,9782ab	-----
dms 10%	0,2260		0,1903		0,3624	

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Tabela 18 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR), matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes isolados, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz esterilizado (LQ EST) (média 5 repetições).

ISOLADO	MSPA(g)	V.P.(%)	MSSR(g)	V.P.(%)	MST(g)	V.P.(%)
I-102	2,0437ab	9,14	2,0156	-3,05	4,0593ab	-6,21
G2-26	1,8445b	-17,99	1,6233	-21,92	3,4678b	-19,88
G20-18	2,0236ab	10,03	1,6300	-21,60	3,6536b	-15,59
CONTROLE	2,2492a	-----	2,0790	-----	4,3282a	-----
dms 10%	0,3162		0,4586		0,6030	

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Com os resultados obtidos no EXPERIMENTO 3 pode-se observar, mais uma vez, uma possível influência da microbiota nativa do solo da série Luiz de Queiroz na atuação das bactérias introduzidas, uma vez que ocorreu promoção do crescimento no solo RC NAT mas não no solo LQ NAT.

Neste experimento observou-se que os isolados estudados não promoveram o crescimento de milho em amostras do solo da Série Luiz de Queiroz esterilizado (Tabela 18).

4.5. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento de diferentes mutantes em casa de vegetação - EXPERIMENTO 4

Apesar da observação da não ocorrência de diferenças na capacidade de colonização dos diferentes mutantes após um período de incubação de uma semana, este experimento foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade de promoção do crescimento dos diferentes mutantes em casa de vegetação.

Para tanto, foram testados os três diferentes mutantes dos seis isolados selecionados no EXPERIMENTO I perfazendo um total de 18 mutantes diferentes.

Os valores de F e os coeficientes de variação para as variáveis analisadas estão apresentados na Tabela 19.

Os dados obtidos para a produção de matéria seca da parte aérea, matéria seca do sistema radicular e matéria seca total, bem como a variação percentual em relação ao controle estão apresentados na Tabelas 20, 21 e 22.

Podemos observar na Tabela 20 que todos os mutantes atuaram de forma positiva na produção de matéria seca da parte aérea (incrementos de 5.41 a 25.63%) sendo que de forma significativa apenas os mutantes 148RN, 42RN,

148RNS, 148RS, 41RN e 136RN..

Tabela 19 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos na análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

	VARIAVEIS ANALISADAS		
	MSPA	MSSR	MST
F [1]	1,2417	2,0509 *	1,2445
C.V.(%)	12,41	11,92	10,16

1 - *-significância a 5% de probabilidade.

Tabela 20 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADO	MSPA(g)	V.P.(%)
148RN	2,4829a	25,63
42RN	2,4482ab	23,87
148RNS	2,4092abc	21,90
148RS	2,4066abc	21,77
41RN	2,3972abc	21,29
136RN	2,3960abc	21,23
136RS	2,3293abcd	17,86
39RN	2,3111abcd	16,93
41RS	2,2890abcd	15,82
39RNS	2,2762abcd	15,17
41RNS	2,2387abcd	13,27
42RS	2,1776abcd	10,18
136RNS	2,1679abcd	9,69
52RS	2,1613abcd	9,35
42RNS	2,1525abcd	8,91
52RNS	2,1512abcd	8,84
52RN	2,1286 bcd	7,70
39RS	2,0833 cd	5,41
CONTROLE	1,9764 d	----
d.m.s. 5% = 0,3530		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5% , pelo teste de Fisher.

Para a variável matéria seca do sistema radicular (Tabela 21) apenas os mutantes 148RNS e 136RN (-5,59 e -2,77%) atuaram negativamente, em relação ao

controle, porém de forma não significativa, enquanto que os demais promoveram o crescimento, com variações de 0,27 a 24,33%. Diferenças significativas ocorrecem apenas para os isolados 39RN, 41RNS e 41RS.

Tabela 21 - Matéria seca do sistema radicular (MSPA) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADO	MSSR(g)	V.P.(%)
39RN	1,9415a	24,33
41RNS	1,8936ab	21,27
41RS	1,8486abc	18,39
52RN	1,8118abcd	16,03
41RN	1,7756abcd	13,71
136RN	1,7134abcde	9,73
42RN	1,7117abcde	9,62
52RS	1,7020abcde	9,00
39RS	1,6824 bcde	7,74
148RS	1,6553 bcde	6,00
42RS	1,6357 cde	4,75
148RN	1,6230 cde	3,94
136RS	1,6126 cde	3,27
52RNS	1,5885 de	1,73
42RNS	1,5843 de	1,46
39RNS	1,5658 de	0,27
CONTROLE	1,5615 de	----
136RNS	1,5182 e	-2,77
148RNS	1,4742 e	-5,59

d.m.s. 5% = 0,2515

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5%, pelo teste de Fisher.

Na Tabela 22, que apresenta dados referentes à produção de matéria seca total (MST), mais uma vez observa-se que todos os isolados atuaram positivamente (incrementos de 4,18 a 19,46% sendo que diferenças significativas foram obtidas para todos os mutantes RN (exceto o 52RN) e para os mutantes 41RS, 41RNS e 148RS.

Tabela 22 - Matéria seca total (MST) e variação percentual (V.P.) em relação ao controle, de plantas de milho inoculadas com diferentes mutantes, em amostras de solo da Série Luiz de Queiroz naturais (LQ NAT) (média de 5 repetições).

ISOLADO	MST(g)	V.P.(%)
39RN	4,2266a	19,46
41RN	4,1729ab	17,94
42RN	4,1600ab	17,58
41RS	4,1377ab	16,95
41RNS	4,1324ab	16,80
136RN	4,1095ab	16,15
148RN	4,1059ab	16,05
148RS	4,0620ab	14,81
136RS	3,9419abc	11,42
52RN	3,9404abc	11,37
148RNS	3,8834abc	9,76
52RS	3,8633abc	9,19
39RNS	3,8420abc	8,59
42RS	3,8114abc	7,73
39RS	3,7658abc	6,44
52RNS	3,7397abc	5,70
42RNS	3,7369abc	5,62
136RNS	3,6861 bc	4,18
CONTROLE	3,5380 c	----

d.m.s. 5% = 0,5036

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 5%, pelo teste de Fisher.

De uma forma geral é interessante notar que a introdução da estreptomicina como marcador, influenciou negativamente a capacidade de promoção do crescimento pelos mutantes testados. De maneira geral, a produção de matéria seca de plantas de milho inoculadas com os mutantes RN foram superiores ao controle. Esta informação sugere mais uma vez que quando necessária a utilização de resistência a antibióticos como marcação, a utilização de estreptomicina não se justifica.

4.6. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento em diferentes épocas de colheita - EXPERIMENTO 5

Foi verificada a capacidade de promoção de crescimento pelos isolados 41RN e 136RN, em seis diferentes épocas de colheita.

Optou-se pela realização de uma análise de variância em cada época de colheita.

A Tabela 23 apresenta os valores de F e os coeficientes de variação obtidos na análise de variância, para as variáveis analisadas nas diferentes épocas de colheita. Observa-se a ocorrência de diferenças significativas apenas para a matéria seca da parte aérea aos 90 dias, e para a matéria seca do sistema radicular aos 15, 75 e 90 dias após a semeadura.

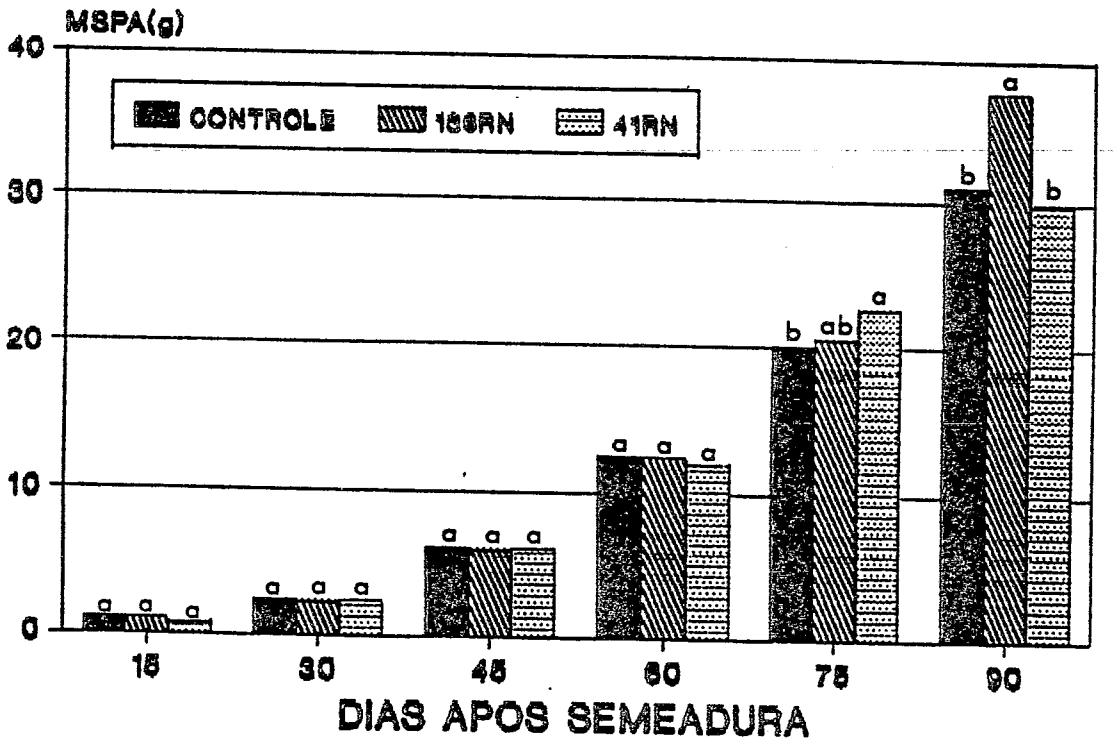
Tabela 23 - Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) obtidos na análise de variância da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) de plantas de milho, inoculadas com diferentes isolados aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a semeadura, utilizando-se amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições).

DIAS		MSPA	MSSR	MST
15	F [1]	1,3842	15,3000 **	0,5342
	C.V.(%)	12,61	18,44	14,99
30	F	0,0390	0,3146	0,1351
	C.V.(%)	26,21	27,97	25,50
45	F	0,0012	0,0186	0,0118
	C.V.(%)	17,94	21,03	18,66
60	F	0,0484	0,4097	0,1561
	C.V.(%)	15,53	24,88	16,96
75	F	1,8214	2,9516 *	1,0887
	C.V.(%)	10,98	32,75	17,07
90	F	3,8581 *	3,7866 *	2,4511
	C.V.(%)	16,77	31,58	16,37

1- *-significância a 10% de probabilidade
** - significância a 5% de probabilidade

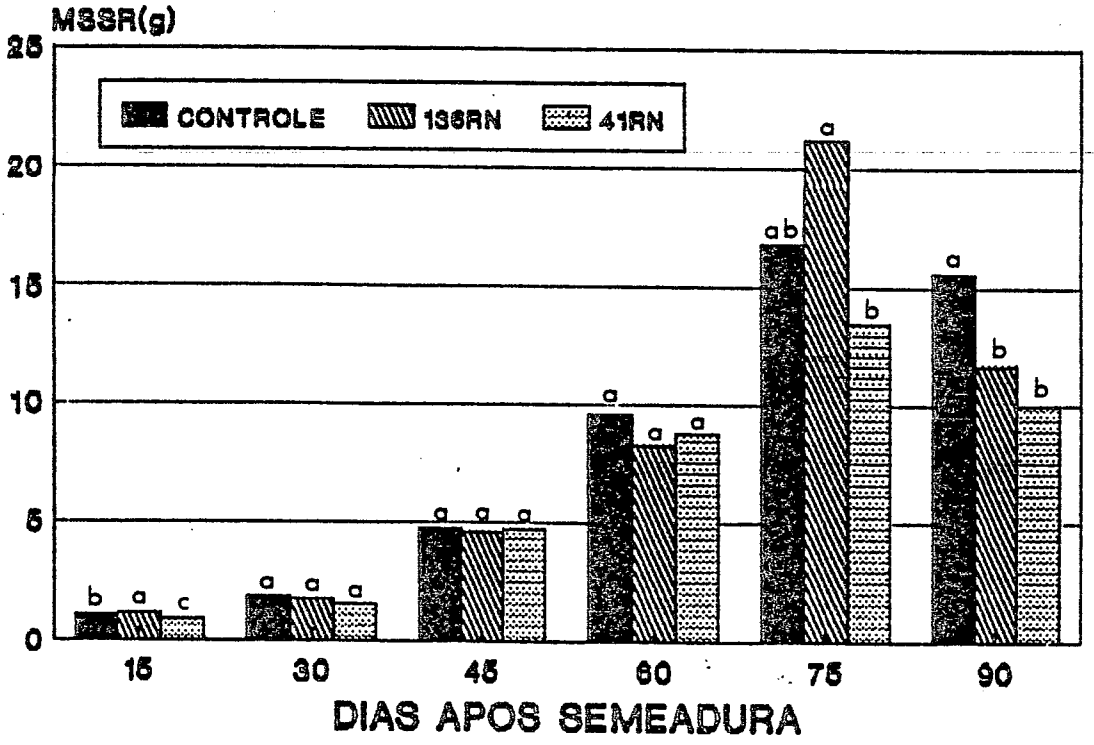
Para a variável matéria seca da parte aérea (Figura 5) observou-se que o isolado 136RN mostrou-se superior ao controle aos 90 dias, com incremento de 21,18%, sendo esta diferença significativa a 10% de probabilidade. Por sua vez o isolado 41RN apresentou-se superior, significativamente, ao controle, aos 75 dias (incremento de 12,42%).

A produção de matéria seca do sistema radicular (Figura 6) diminuiu significativamente com a introdução do isolado 41RN aos 15 dias, com variação de -9,37% e aos 90 dias (-36,10%). Nas demais épocas de colheita também ocorreram diminuições na produção de matéria seca desta variável, sem entretanto diferir, estatisticamente, do controle. Para o isolado 136RN, ocorreram incrementos aos 15 dias (9,47%) e aos 75 dias, significativos (22,52%). Para as demais épocas de colheita ocorreram decréscimos na produção de matéria seca do sistema radicular, sendo esta diferença significativa apenas aos 90 dias após a semeadura (-25,09%). Na produção de matéria seca total (Figura 7) não ocorreram diferenças significativas em relação ao controle, em nenhum dos tratamentos, nas diferentes épocas de colheita.



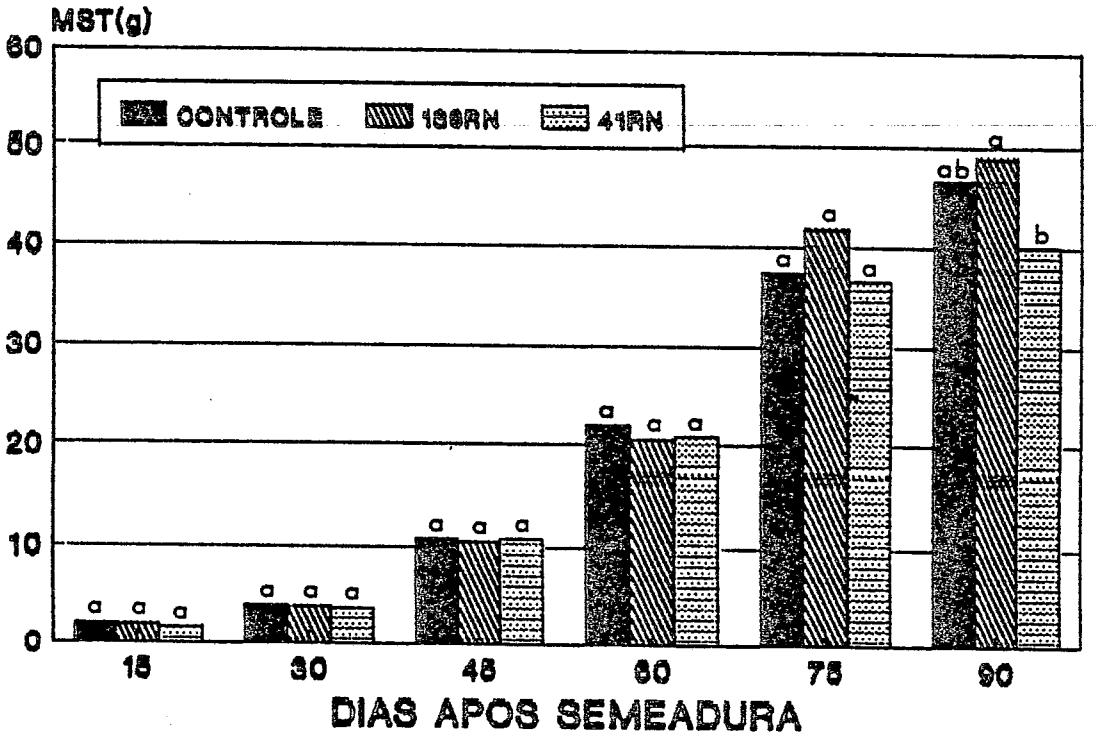
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Figura 5 - Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições).



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Figura 6 - Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca do sistema radicular (MSSR) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições).



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de 10%, pelo teste de Fisher.

Figura 7 - Efeito da inoculação dos isolados 41RN e 136RN na produção de matéria seca total (MST) de plantas de milho em diferentes épocas de colheita, em amostras de solo da Série Ribeirão Claro naturais (RC NAT) (média de 5 repetições).

O objetivo da bacterização de sementes com isolados de **Pseudomonas** sp., possíveis promotores de crescimento de plantas, resume-se na busca de melhores produções das plantas cultivadas. Assim, sugere-se que este tipo de experimentação seja realizado em condições de campo, utilizando-se como parâmetro de avaliação a produção da cultura, embora a seleção prévia dos isolados de RPCPs seja feita em condição de casa de vegetação.

A avaliação da promoção de crescimento por RPCP é, geralmente, realizada no início do desenvolvimento da planta (aproximadamente 15 dias) em experimentos conduzidos em casa de vegetação, ou no final do ciclo da cultura (estimação da produção), quando em condição de campo. Neste experimento, observou-se efeito significativo da introdução dos isolados, apenas aos 75 e 90 dias após a semeadura.

5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho forneceu resultados que permitem tirar as seguintes conclusões:

(1) A utilização do método de marcação genética dos isolados, através da obtenção de mutantes espontâneos resistentes à rifampicina e ácido nalidíxico, foi eficiente para monitorar a colonização das raízes pelo isolado introduzido.

(2) A introdução da estreptomicina como marcador não se justificou, uma vez que não foram observadas alterações na capacidade de colonização do mutante, bem como, na promoção do crescimento.

(3) Não foi observada relação de especificidade entre os isolados empregados. Isolados obtidos de rizosfera de outras plantas apresentaram capacidade de promoção do crescimento de plantas de milho, porém, esta foi influenciada pelas condições de solo natural ou esterilizado.

(4) Os isolados 41RN e 136RN apresentaram capacidade de antecipar a emergência de plantas de milho, em três dias, quando se utilizou amostras de solo natural. Nas amostras esterilizadas não houve efeito desses isolados sobre a emergência.

(5) A capacidade de promoção do crescimento foi afetada pela introdução dos isolados 41RN e 136RN aos 75 e 90 dias após a semeadura.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.

ARORA, D.K.; FILONOW, A.B.; LOCKWOOD, J.L. Bacterial chemotaxis to fungal propagules **in vitro** and in soil. **Journal of Microbiology**, Ottawa, 29(9):1104-9, Sept. 1983.

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, July 1987.

BAKER, R. Mecanisms of biological control of soil-borne pathogens. **Annual Reviews in Phytopathology**, Palto Alto, 6:263-94, 1968.

BAKKER, A.W. & SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and **Pseudomonas ssp.** - mediated plant growth - stimulation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 19(4):451-7, July 1987.

BAKKER, P.A.H.M.; BAKKER, A.W.; MARUGG, J.D.,WEISBEEK, P.J.; SCHIPPERS, B. Bioassay for studying the role of siderophore in potato growth stimulation by **Pseudomonas** ssp. in short potato rotations. **Soil Biology &**

Biochemistry, Oxford, 19:443-9, July 1987.

BAKKER, P.A.H.M.; LAMERS, J.G.; BAKKER, A.W.; MARUGG, J.D.; WEISBEEK, P.J.; SCHIPPERS, 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**:249-56, 1986.

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, May 1986a.

BASHAN, Y. Migration of the rhizosphere bacteria **Azospirilllum brasiliense** and **Pseudomonas fluorescens** towards wheat roots in the soil. **Journal of General Microbiology**, Colchester, **132**(12):3407-14, Dec. 1986b.

BECKER, J.O. & COOK, R.J. Role of siderophores in suppression of **Pythium** species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, St. ul, **78**(6):778-82, June 1988.

BENNETT, R.A. & LYNCH, J.M. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. **Journal of General Microbiology**, Colchester, **125**(1):95- 102, July 1981.

BOWEN, G.D. & ROVIRA, A.D. Microbial colonization of plant roots. **Annual Reviews in Phytopathology**, Palto Alto, 14:121-44, 1976.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 12:181-97, 1974.

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

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

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

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

BURR, T.J. & CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Scienses**, Boca Raton, 2(1):1-20, 1985.

BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strainins of **Pseudomonas fluorescens** and **P. putida**. Phytopathology, St. Paul, 68(9):1395-401, Sept. 1978.

BUYER, J.S. & LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious **Pseudomonas** strains. **The Journal of Biological Chemistry**, **261**(2):791-4. Jan. 1986.

CAMPBELL, R. Ultrastructural studies of **Gaeumannomyces graminis** in the waterfilm on wheat roots and the effect of clay on the interaction between this fungus and antagonistic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **29**(1):39-45, Jan. 1983.

CAMPBELL, R. & CLOR, A. Soil moisture affects the interaction between **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici** and antagonistic bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, **17**(4):441-6, July 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**, Colchester, **129**(3):771-7, Mar. 1983.

CAPPER, A.L. & CAMPBELL, R. The effect of artificially inoculated antagonistic bacteria on the prevalence of take-all disease of wheat in field experiments. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **60**(2):155-60, Feb. 1986.

CHANG, I.-pin & KOMMEDAHL, T. Biological control seedling of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. **Phytopathology**, St. Paul, **58**(10):1395-

401, Oct. 1968.

COLYER, P.D. & MOUNT, M.S. Bacterization of potatoes with **Pseudomonas putida** and its influence on postharvest sof rot diseases. **Plant Disease**, St. Paul, 68(8):703-6, 120. Aug. 1984.

COOK, R.J. & ROVIRA, A.D. The role of bacteria in the biological control of **Gaeumannomyces graminis** by suppressive soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 8(4):269-73, July 1976.

COOPER, R. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. **Soil and Fertilizer**, Farnham Royal, 22(5):327-33, Oct. 1959.

COSTERTON, J.W. Direct ultrastructural examination of adherent bacterial populations in natural and pathogenic ecosytems. In:KLUG,M.J. & REDDY,C.A., ed. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington, Am. Soc. Microbiol., 1984. p.115-23.

DE WEGER, L.A.; VLUGT, C..I.M. van der; WIJFJES, A.H.M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B.; LUGTENBERG, B. Flagella of plant-growth-stimulating **Pseudomonas fluorescens** strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, 169(6):2769-73, 1987.

DUPLER, M. & BAKER, R. Survival of **Pseudomonas putida**, a biological control agent, in soil. **Phytopathology**, St. Paul, 74(2):195-200, Feb. 1984.

EKLUND, E. Secondary effects of some pseudomonads in the rhizoplane of peat grown cucumber plants. **Acta Agriculture Scandinavica**, Stockholm, 17(supl.):1-57, 1970.

ELAD, Y. & BAKER, R. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of **Fusarium oxysporum**. **Phytopathology**, St. Paul, 75(9):1047-52, Sept. 1985a.

ELAD, Y. & BAKER, R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of **Fusarium** ssp. by **Pseudomonas** ssp. **Phytopathology**, St. Paul, 75(9):1053-9, Sept. 1985b.

ELAD, Y. & CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of **Puthium** damping-off by bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, 77(2):190-5, Feb. 1987.

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

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, July 1985.

FREDRICKSON, J.K. & ELLIOTT, L.F. Colonization of winter wheat roots by inhibitory rhizobacteria. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, 49(5):1172-7,

Oct. 1985.

FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de **Pseudomonas** sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 13(1):31-4, jan./abr. 1989.

FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações antagônicas entre **Pseudomonas** sp. e fungos do gênero **Fusarium** em rizosfera de tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 22., Recife, 1989. **Programas e Resumos**. Recife, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1989 p. 105-6.

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.

GEELS, F.P.; LAMERS, J.G.; HOEKSTRA, O.; SCHIPPERS, B. Potato plant response to seed tuber bacterization in the field in various rotations. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, 92:257-72, 1986.

GRAHAM-WEISS, L.; BENNET, M.L.; PAAV, A.S. Production of bacterial inoculantes by direct fermentation on nutrient - supplemented vermiculite. **Applaied and Enviromental Microbiology**, Washington, **53**(9):2138-40, Sept. 1987.

GRIFFIN, D.M. & QUAIL, G. Movement of bacteria in moist, particulate systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, **21**:579-82, 1968.

GRIMES, H.D. & MOUNT, M.S. Influence of **Pseudomonas putida** on nodulation of **Phaseolus vulgaris**. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, **16**(1):27-30, 1984.

GUTTERSON, N.I.; LAYTON, T.J.; ZIEGLE, J.S.; WARREN, G.J. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseumonad. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **165**(3):696-703, 1986.

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**, Baltimore, **170**(1):380-5, 1988.

HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Control of **Rhizoctonia solani** on cotton seedlings with **Pseudomonas fluorescens** and with an antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, St. Paul, **69**(5):480-2, May 1979.

HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Suppression of **Pytium ultimum**-induced damping-off of cotton seedlings by **Pseudomonas fluorescens** and its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology**, St. Paul, **70**(8):712-5, Aug. 1980.

HOWIE, W.J. & ECHANDI, E. Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, **15**(2):127-32, Mar. 1983.

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

JAMES, D.W. & GUTTERSON, N.I. Multiple antibiotics produced by **Pseudomonas fluorescens** HV37a and their differential regulation by glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **52**(5):1183-9, Nov. 1986.

JUHKE, M.E.; MATHRE, D.E.; SANDS, D.C. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **53**(12):2793-9, Dec. 1987.

KATZNELSON, H. & COLE, S.E. Production of gibberellin like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **11**(4):733-41, Aug. 1965.

KAVIMANDAN, S.K. & GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with **Pseudomonas** sp. on phosphate uptakeand 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 populations of **Erwinia carotovora** on potato roots and daugter tubers. **Phytopathology**, St. Paul, 73(2):217-9, Feb. 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, June 1981a.

KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, St. Paul 71(6):642-4, June 1981b.

KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth and the displacent of root microflora. **Phytopathology**, St. Paul, 71(10):1020-4, Oct. 1981c.

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, Nov. 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, Aug. 1980b.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZ, M.; SCHROTH, M.N. **Pseudomonas** siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soil. **Current Microbiology**, New York, 4:317-20, 1980c.

KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: SWINBURNE,T.R., ed. **Iron, siderophore and plant diseases**. New York, Plenum, 1986. p.155-64.

KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 31(10):926-9, Oct. 1985.

KOMMEDAHL, T & NEW, C.L. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. **Phytopathology**, St. Paul, 65(3):296-300, Mar. 1975.

LEISINGER, T. & MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. **Microbiological Reviews**, 43(3):422-42, Sept. 1979.

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):1592-5, Nov. 1987.

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

LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; YIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapessed) seedlings by a strain of **Pseudomonas putida** under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottaw, 33(5):390-5, May 1987.

LIFSHITZ, R.; SIMONSON, C.; SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; RODRICK-SEMPLE, C.; ZALESKA, I. Effect of rhizobacteria on thr severity of phytophthora root of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, 8:102-6, 1986.

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, Feb. 1988.

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, Feb. 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, Dec. 1984.

MAGAZIN, M.D.; MOORES, J.C.; LEONG, J. Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting

Pseudomonas strain. **The Journal of Biological Chemistry**, 261(2):795-9, Jan. 1986.

MISAGHI, I.J.; STOWELL, L.T.; GROGAN, R.G.; SPEARMAN. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, St. Paul, 72(1):33-6, Jan. 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, July 1985.

NEILANDS, J.B. Microbial iron compounds. **Annual Review Biochemistry**, Palto Alto, 50:715-31, 1981.

PARKE, J.L.; MOEN, R.; ROVIRA, A.D.; BOWEN, G.D. Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, **Pseudomonas fluorescens**. **Soil Biology & Biochemistry** Oxford, 18(6):583-8, Nov. 1986.

POLONENKO, D.R.; SCHER, F.M., KLOEPPER, J.W., SINGLETON, C.A., LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Effects of roots colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by **Bradyrhizobium japonicum**. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottaw, 33(6):498-503, June 1987.

RANDHAWA, P.S., & SCHAAD, N.W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, St. Paul, 75(2):254-9, Mar. 1985.

RHODES, D.J.; LOGAN, C.; GROSS, D.C. Selection of **Pseudomonas** spp. inhibitory to potato seed tuber decay. **Phytopathology**, St. Paul, **77**(7):1078, July 1987.

ROSENZWEIG, W.D. & STOTZKY, G. Influence of enviromental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: clay minerals and pH. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **38**(6):1120-6, Dec. 1979.

ROUAT, J.W. & KATZNELSON, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crops plants. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **24**(2):164-71, Aug. 1961.

ROVIRA, A.D. Root excretion in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant ligth, tempereture, and calcium nutrition on exudation. **Plant and Soil**, Dordrecht, **11**:53-64, 1959.

ROVIRA, A.D. Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rizosphere and their effects on maize, tomato,and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, **19**(3):304-14, 1963.

SCHER, F.M. & BAKER, R. Mechanism of biological control in a **Fusarium** supressive soil. **Phytopathology**, St. Paul, **70**(5):412-7, May 1980.

SCHER, F.M. & BAKER, R. Effect of **Pseudomonas putida** and synthetic iron chelator on induction of soil supressiveness to **Fusarium** wilt pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, **72**(12):1567-73, Dec. 1982.

SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.A. Chemotaxis of fluorescent **Pseudomonas** spp. to soybean seed exudates "in vitro" and soil. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, 31(6):570-4, June 1985.

SCHER, F.M.; ZIEGLE, J.S.; KLOEPPER, J.W. A method for assessing the root colonizing capacity of bacteria on maize. **Canadian Journal Microbiology**, Otawa, 30(2):151-7, Feb. 1984.

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 Phytopathology**, Palto Alto, 25:339-58, 1987.

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-supressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, Washington, 216(4553):1376-81, June 1982.

SCHROTH, M.N.; LOPER, J.E.; HILDEBRAND, D.C. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. In:KLUG,M.J. & REDDY,C.A.(ed.). **Current Perspectives in Microbial Ecology**. Washington, Am. Soc. Microbiol., 1984. p.362-369.

SMILEY, R.W. Antagonists of **Gaeumannomyces graminis** from the rhizoplane of wheat in the soils fertilized with ammonium or nitrate-nitrogen. **Soil Biology &**

Biochemistry, Oxford,**10**(3):169-74, May 1978a.

SMILEY, R.W. Colonization of wheat roots by **Gaeumannomyces graminis** inhibited by specific soils, microorganisms and ammonium nitrogen. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, **10**(3):175-9, May 1978b.

SNEH, B.; DUPLER, M.; ELAD, Y; BAKER, R. Chlamydospore germination of **Fusarium oxysporum** sp. **cucumerinum** as affected by fluorescent and lytic bacteria from **Fusarium**-supressive soil. **Phytopathology**, St. Paul, 74(9):1115-24, Sept. 1984.

STUTZ, E.W.; DEFAGO, G.; KERN, H. Naturally occurring fluorecent pseudomonads involved in supression of black root rot of tobacco. **Phytopathology**, St. Paul, 76(2):181-5, Feb. 1986.

SUSLOW, T.V. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: LACY,G. & MOUNT,M.,ed. **Phytopathogenic Prokaryotes**. New York, Academic Press, 1982. V.2,p.178-223.

SUSLOW, T.V. & SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, St. Paul, 72(1):111-5, Jan. 1982a.

SUSLOW, T.V. & SCHROTH, M.N. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, St. Paul, 72(2):199-206, Feb. 1982b.

TEINTZE, M. & LEONG, J. Structure of pseudobactin A, a second siderophore from plant growth promoting **Pseudomonas** B10. **Biochemistry**, Washington, **20**(22):6457-62, 1981.

TEINTZE, M.; HOSSAIN, M.B.; BANNES, C.L.; LEONE, J.; HELM, D.van de. Structure of ferric pseudobactin, a siderophores from a plant growth promoting **Pseudomonas**. **Biochemistry**, Washington, **20**(22):6446-57, 1981.

THOMASHOW, L.S. & WELLER, D. Role of a phenazine antibiotic from **Pseudomonas fluorescens** in biological control of **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici**. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **170**(8):3499-508, Aug. 1988.

VESPER, S.J. Production of pili (fimbriae) by **Pseudomonas fluorescens** and correlation with attachment of corn roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **53**(7):1397-405, July 1987.

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

WELLER, D.M. Distribuition of a take-all supressive satrain of **Pseudomonas fluorescens** on seminal roots of winter wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **48**(4):897-9, Oct. 1984.

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

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

WELLER, D.M. & COOK, R.J. Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of **Pythium** control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, 8:328-34, 1986.

WELLER, D.M.; HOWIE, W.J.; COOK, R.J. Relationship between in vitro inhibition of **Gaeumannomyces graminis** var. **tritici** and supression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, St. Paul, 78 (8):1094-100, Aug. 1988.

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

WONG, P.T.W. & BAKER, R. Suppression of wheat take-all and **Ophiobolus patch** by fluorescent pseudomonads from a fusarium-suppressive soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford ,16(4):397-403, July 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, Apr. 1986a.

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