

Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento e controle da podridão radicular em alface hidropônica¹

Matheus Aparecido Pereira Cipriano², Flávia Rodrigues Alves Patrício³ e Sueli dos Santos Freitas^{2*}

¹Parte da tese de mestrado do primeiro autor, apresentada à PG-IAC em abril de 2009. ²Instituto Agrônomo (IAC). Caixa Postal 28, CEP 13001-970, Campinas, SP. ³Instituto Biológico, Caixa Postal 70, CEP 13012-970, Campinas, SP.

Autor para correspondência: Sueli dos Santos Freitas (sfreitas@iac.sp.gov.br)

Data de chegada: 29/05/2012. Aceito para publicação em: 30/03/2013.

1828

RESUMO

Cipriano, M.A.P.; Patrício, F.R.A.; Freitas, S.S. Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento e controle da podridão radicular em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica*, v.39, n.1, p.51-57, 2013.

Os objetivos do trabalho foram avaliar se isolados de rizobactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*: 1) produzem metabólitos envolvidos na promoção do crescimento (AIA e HCN); 2) têm potencial para controle biológico de *Pythium aphanidermatum*; 3) podem promover o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico; 4) e verificar se há correspondência nas interações *in vitro* e *in vivo* desses microrganismos. Com esses objetivos, placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água, com ou sem *Pythium aphanidermatum*, receberam sementes pré-germinadas de alface tratadas com os isolados de rizobactérias. Os comprimentos do hipocótilo e da radícula foram medidos cinco ou sete dias após a incubação a 28 °C. Dois experimentos foram conduzidos em

casa de vegetação com plantas de alface hidropônica e 17 isolados bacterianos. As unidades experimentais receberam a suspensão dos isolados de *Pseudomonas* spp. e, uma semana depois, a suspensão de zoósporos de *P. aphanidermatum*. Avaliaram-se o escurecimento das raízes e a massa de matéria seca da parte aérea e das raízes das plantas. Os isolados produzem metabólitos que beneficiam o crescimento de alface mesmo na presença do patógeno. Os isolados LP15, LP25, LP28, LP44 e LP47 reduziram os danos causados por *P. aphanidermatum* nos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*. Este é o primeiro estudo que demonstrou que rizobactérias obtidas de solos brasileiros têm potencial para promover o controle biológico de *P. aphanidermatum* e o crescimento de plantas de alface em sistemas hidropônicos.

Palavras-chave adicionais: *Pseudomonas*, *Pythium aphanidermatum*, cultivo protegido.

ABSTRACT

Cipriano, M.A.P.; Patrício, F.R.A.; Freitas, S.S. Potential of rhizobacteria to promote root rot growth and control in hydroponically cultivated lettuce. *Summa Phytopathologica*, v.39, n.1, p.51-57, 2013.

The aims of this study were to evaluate whether rhizobacteria isolates of the fluorescent group of the genus *Pseudomonas*: 1) produce metabolites involved in growth promotion (AIA and HCN); 2) have the potential for the biological control of *Pythium aphanidermatum*; 3) promote the growth of lettuce cultivated in hydroponic system; 4) show correspondence in the *in vitro* and *in vivo* interactions. Thus, Petri dishes containing agar-water culture medium, with or without *Pythium aphanidermatum*, received pre-germinated seeds of lettuce treated with the rhizobacteria isolates. The lengths of the hypocotyl and radicle were measured at five or seven days after incubation at 28 °C. Two experiments were carried out in a greenhouse

with hydroponic lettuce plants and 17 bacterial isolates. The experimental units received *Pseudomonas* spp. isolate suspension and, one week later, *P. aphanidermatum* zoospore suspension. The plants were evaluated for root darkening and shoot and root dry matter mass. The isolates produce metabolites which benefit the growth of lettuce even in the presence of the pathogen. The isolates LP15, LP25, LP28, LP44 and LP47 reduced the damage caused by *P. aphanidermatum* in experiments *in vitro* and *in vivo*. This is the first study which demonstrated that rhizobacteria obtained from Brazilian soils have the potential to promote the biological control of *P. aphanidermatum* and the growth of lettuce plants in hydroponic systems.

Additional keywords: *Pseudomonas*, *Pythium aphanidermatum*, protected cultivation.

Alface é a hortaliça folhosa mais produzida em sistemas hidropônicos no Brasil devido à boa qualidade desses sistemas e do produto obtido. Além disso, há diminuição dos danos causados por patógenos veiculados pelo solo (23, 24). No entanto, o cultivo hidropônico favorece o desenvolvimento de *Pythium* spp. pela baixa diversidade de microrganismos, liberação de exsudatos radiculares ricos em carbono, temperaturas adequadas, fornecimento de oxigênio, mecanismos rápidos, eficientes e uniformes de disseminação de zoósporos no ambiente (22, 26). Mesmo sem sintomas visíveis,

como escurecimento e podridão radicular, *Pythium* spp. podem causar perdas em plantas então denominadas assintomáticas (25). Além de ser difícil o controle de doenças causadas pelo patógeno no cultivo hidropônico, a falta de produtos registrados limita o cultivo de alface nesse sistema (22). Uma alternativa interessante para combater espécies de *Pythium* é o controle biológico, que pode ocorrer por diversos mecanismos de atuação, entre os quais indução de resistência, antibiose, competição, hiperparasitismo, predação e hipovirulência (6).

As rizobactérias estão entre os microrganismos mais promissores que podem ser usados para o controle biológico em sistemas hidropônicos, por colonizar as raízes das plantas e sobreviver nelas antes de serem infectadas pelo patógeno (4,13). Além disso, rizobactérias, como as do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, podem promover o crescimento de plantas em diferentes culturas, como, por exemplo, plantas cítricas (4, 8). Esses benefícios são decorrentes, por exemplo, da produção de fitormônios, como o ácido-indol-acético (AIA), que podem ser sintetizados por esses microrganismos, além do ácido cianídrico (HCN), composto volátil que inibe o desenvolvimento de fitopatógenos no ambiente (29).

Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar se isolados de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp.: 1) produzem metabólitos envolvidos na promoção do crescimento (AIA e HCN) de mudas de alface; 2) têm potencial para controle biológico de *Pythium aphanidermatum*; 3) podem promover o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico; e 4) verificar se há correspondência nas interações *in vitro* e *in vivo* desses microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

A identificação, a classificação e a origem dos isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente estão apresentadas na tabela 1. Essas informações estão detalhadas em Coelho et al. (6).

Tanto *in vitro* como *in vivo*, a concentração das suspensões bacterianas utilizadas foi determinada por absorbância a 600 nm. O valor obtido foi de 1,27, que corresponde a $1,1 \times 10^9$ UFCs mL⁻¹.

Para detectar a produção de ácido-indol-acético (AIA) realizou-se um experimento *in vitro*, semelhante ao descrito por Bric et al.

(5), onde os isolados foram cultivados em meio de cultura com L-triptofano, um precursor do AIA. Depois, uma membrana de nitrocelulose foi colocada sobre o meio de cultura com os isolados e esse material foi incubado a 28 °C por 24 horas. Em seguida, essa membrana foi mergulhada em solução de Salkowski e a formação de um halo vermelho-arroxeadado ao redor das colônias, na membrana, indicou a produção de AIA.

A produção de ácido cianídrico (HCN) foi determinada com base na metodologia descrita por Bakker & Schippers (3), pela qual os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio B de King suplementado com glicina. Na parte superior da placa colocou-se uma folha de papel filtro umedecido com solução de ácido pícrico a 5% e Na₂CO₃ a 2%. Depois de 24 horas de incubação a 28 °C, a mudança da coloração do papel de amarelo para vermelho-alaranjado indicou a produção de HCN pelos isolados. Nas avaliações da produção de AIA e de HCN as observações foram feitas em cinco diferentes placas de Petri para cada isolado.

Além da produção de metabólitos, a promoção de crescimento e o controle biológico também foram testados *in vitro*. Placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água, segundo metodologia adaptada de Teixeira (26), receberam 10 sementes de alface cultivar Verônica tratadas por 10 minutos, separadamente, com suspensões dos isolados de *Pseudomonas* spp. para verificação de promoção de crescimento. Para os testes de controle biológico, a mesma metodologia foi utilizada. No entanto, adicionou-se, ao centro das placas, um disco de meio de cultura V8 com micélio de *Pythium aphanidermatum*. As placas foram mantidas a 28 °C ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, por um período entre cinco e sete dias. Decorrido o tempo de incubação avaliaram-se os comprimentos do hipocótilo e da radícula. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a parcela representada por uma placa de Petri. Os experimentos foram analisados em delineamento fatorial 2 (com e sem *P. aphanidermatum*)

Tabela 1. Identificação, classificação e origem dos isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* sp. utilizados e sua capacidade de produzir (+) ou não (-) ácido indol-acético (AIA) e ácido cianídrico (HCN).

Isolados	Classificação	Origem	AIA**	HCN**
LP 10	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Alface	-	+
LP 12	<i>P. putida</i>	Alface	-	+
LP 13	<i>P. putida</i>	Alface	+	-
LP 15	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Rúcula	-	+
LP 16	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Rúcula	+	+
LP 17	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Alface	+	-
LP 22	<i>P. fluorescens</i>	Chicória	-	-
LP 25	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Alface	-	+
LP 28	<i>P. putida</i>	Alface	-	+
LP 44	<i>P. fluorescens/P. putida</i>	Alface	+	+
LP 47	<i>P. putida</i>	Rúcula	+	+
MP 1	ND*	Rúcula hidropônica	+	+
Ps 21A	ND	Algodoeiro	+	+
Ps 143C	ND	Rúcula	-	-
Ps 864C	ND	Alface	+	-
Ps 866B	ND	Alface	-	+
Ps 871B	ND	Alface	+	+

*ND: classificação não determinada.

**As observações foram feitas em cinco diferentes placas de Petri e os resultados foram os mesmos em todas as placas.

x 4 (isolados de *Pseudomonas* spp. MP1, Ps21A e Ps143C e controle) para o experimento 1; 2 x 5 (isolados LP10, LP12, LP13 e LP16 e controle), para o experimento 2, 2 x 6 para os experimentos 3 (isolados LP15, LP17, LP22, LP25 e LP 28 e controle) e 4 (isolados LP44, LP47, Ps864C, Ps866B e Ps871B e controle). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de variância e as médias, comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Realizaram-se dois experimentos *in vivo*, em casa-de-vegetação. As plantas de alface foram cultivadas em sistema hidropônico composto por pequenos recipientes plásticos (*Container Culture* – CC) com dimensões de 13,5 x 15 cm, com capacidade para dois litros de solução nutritiva, sendo o arejamento da solução feito por um compressor. A utilização de recipientes separados para cada parcela permitiu que não houvesse contaminação das plantas com isolados de rizobactérias e com *P. aphanidermatum*.

Sementes peletizadas de alface crespa cv. Verônica foram semeadas em espumas fenólicas com dimensões de 2 x 2 x 2 cm (*Green-up* - Atlanta®). Quando atingiram o ponto de desenvolvimento ideal, aproximadamente 15 dias após a emergência (DAE), foram transplantadas para os recipientes com solução nutritiva. A água utilizada em todos os experimentos foi destilada e esterilizada e a solução nutritiva, formulada de acordo com a recomendação de Furlani et al. (9). Durante a condução dos experimentos, a condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 1,5 mS. Aplicaram-se 10 mL das suspensões dos isolados aproximadamente aos 22 DAE, separadamente, em cada planta de alface individualizada nos recipientes. Uma semana após a adição da suspensão bacteriana, 10 mL da suspensão de zoósporos (10^4 mL⁻¹) do patógeno foram também colocados nos recipientes com as plantas. A metodologia utilizada para obtenção dos zoósporos foi a descrita por Rahimian & Banihashemi (21), pela qual o patógeno é cultivado em meio de cultura V8 e água destilada e esterilizada é adicionada e mantida em temperatura entre 20 e 35 °C.

No primeiro experimento, testaram-se 11 isolados de *Pseudomonas* spp. (LP10, LP12, LP13, LP15, LP16, MP1, Ps21A, Ps143C, Ps864C, Ps866B e Ps871B). No segundo, 6 isolados (LP17, LP22, LP25, LP28, LP44 e LP47) foram testados.

Para confirmação da presença do patógeno no sistema hidropônico, realizou-se, no momento da colheita, coleta das raízes das plantas-controle e das plantas de alface tratadas com a suspensão de zoósporos de *P. aphanidermatum*. O material coletado foi levado ao laboratório, onde as raízes foram lavadas com água destilada e esterilizada e posteriormente colocadas em placas de Petri com meios de cultura BDA e V8. Outra forma utilizada para verificação do patógeno no sistema foi o plaqueamento da solução nutritiva. Para tanto, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas nos mesmos meios de cultura utilizados para isolamento do patógeno a partir das raízes.

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre as plantas foi feita cerca de vinte e cinco dias depois da aplicação da suspensão do patógeno. No momento da colheita atribuíram-se notas ao escurecimento das raízes, baseada na escala usada por Khan et al. (14), com algumas adaptações, sendo as notas 1 = 0-20 %, 2 = 21-40 %, 3 = 41-60 %, 4 = 61-80 %, 5 = 81-100 % de severidade da podridão de raízes. A parte aérea das plantas foi separada das raízes na altura do caule e ambas permaneceram em estufa a 60 °C até obtenção de massa constante de matéria seca. Os dados referentes às notas foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, e os de matéria seca, à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, também a 5%.

Nos experimentos *in vitro*, observou-se que 53 % dos isolados (correspondente a nove isolados) foram capazes de produzir AIA e 70 % (doze isolados) produziram HCN, sendo que os isolados LP16, LP44, LP 47, MP1 e Ps871B produziram os dois metabólitos (Tabela 1). Os resultados apresentados referem-se às avaliações feitas em cinco placas de Petri, sendo iguais em todas as placas, para cada tratamento apresentado.

Nos experimentos de promoção de crescimento e controle biológico *in vitro*, os isolados MP1, Ps143C, Ps21A (experimento 1), LP 10, LP 12, LP 16 (experimento 2), LP 15, LP17, LP 22, LP 25, LP 28 (experimento 3), LP 44 e LP 47 (experimento 4) resultaram em maior comprimento de radícula que o controle, entre as plantas que receberam o inóculo de *P. aphanidermatum* (Tabela 2). As plântulas sem o patógeno apresentaram maiores comprimentos de radículas do que as com o patógeno. Alguns isolados dos isolados que promoveram o crescimento da radícula – LP15, LP25 e LP28 (experimento 3) – também resultaram em maiores comprimentos do hipocótilo nos tratamentos com *P. aphanidermatum*, quando comparados ao controle (Tabela 2). Esses três isolados foram reconhecidos como produtores de HCN, que atua como um antifúngico no controle de doenças causadas por diversos patógenos (Marques et al., 17).

Em alguns tratamentos sem patógeno os isolados de rizobactérias LP44, Ps864C e Ps871B (experimento 4) propiciaram maior crescimento radicular, o que evidenciou a promoção de crescimento não ligada a controle do patógeno. O isolado LP44 ainda exerceu o mesmo efeito benéfico na presença do patógeno, assim como o isolado LP47, no mesmo experimento (Tabela 2). É possível que esses isolados produtores de HCN e AIA tenham usado esses mecanismos de promoção de crescimento de raízes e controle biológico nas plântulas de alface (11; 15). Os experimentos *in vitro* sugerem que os isolados de *Pseudomonas* podem prevenir a infecção pelo patógeno nas sementes, resultado que concorda com estudos feitos por Gravel et al. (10), que observaram o controle do tombamento de plântulas de tomate causado por *Pythium aphanidermatum* por várias espécies de *Pseudomonas*: *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. syringae* e *P. viridiflava*.

O efeito benéfico sobre o crescimento radicular de plantas de alface *in vitro* observado neste estudo também já foi detectado por Patekoski et al. (19), que confrontaram *Pythium aphanidermatum* e um produto comercial a base de *Trichoderma*, fungo muito estudado em trabalhos de controle biológico. No caso particular de alface, os testes *in vitro* realizados ocorrem quando as plântulas estão em estágio de crescimento semelhante àquele em que são produzidas as mudas.

No primeiro experimento *in vivo*, realizado em casa-de-vegetação, as plantas tratadas com os isolados LP15, MP1, Ps21A e Ps864C tiveram maior massa de matéria seca de parte aérea que o controle sem o patógeno e o com o patógeno (Figura 1A), e os tratamentos com os isolados MP1, Ps864C, Ps866B e Ps871B resultaram em maior quantidade de matéria seca de raízes (Figura 1B). Os isolados MP1 e Ps864C tiveram efeito positivo tanto sobre a parte aérea quanto sobre as raízes.

Não houve diferença entre as plantas do tratamento controle e as tratadas apenas com o patógeno. Nessa condição, sem detecção do efeito do patógeno, não haveria como observar controle da doença. No entanto, houve aumento da matéria seca, que pode ter sido desencadeado por substâncias contidas nos exsudatos liberados pelas rizobactérias, como o ácido indol-acético, que podem aumentar o crescimento de raízes (11). Dentre os seis isolados benéficos citados,

Tabela 2. Comprimento (cm) do hipocótilo e da radícula de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e na ausência de *Pythium aphanidermatum*. Experimentos 1, 2, 3 e 4.

Experimento 1		Hipocótilo (cm)		Radícula (cm)	
Tratamentos	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	
Controle	1,02 a A*	0,83 a A	4,70 a A	1,04 b B	
MP1	1,60 a A	1,02 a A	4,85 a A	2,97 a B	
Ps21A	1,33 a A	1,32 a A	4,96 a A	2,75 a B	
Ps143C	1,20 a A	1,05 a A	4,68 a A	3,06 a B	
CV (%)	44,54		29,06		
Experimento 2		Hipocótilo (cm)		Radícula (cm)	
Tratamentos	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	
Controle	1,53 a A*	0,66 a B	2,73 a A	0,46 b B	
LP10	1,57 a A	0,77 a B	2,28 a A	0,99 a B	
LP12	1,54 a A	0,78 a B	2,60 a A	0,93 a B	
LP13	1,57 a A	0,25 b B	2,52 a A	0,24 b B	
LP16	1,74 a A	0,91 a B	2,08 a A	1,13 a B	
CV(%)	23,15		25,98		
Experimento 3		Hipocótilo (cm)		Radícula (cm)	
Tratamentos	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	
Controle	0,51 a A*	0,19 b B	3,73 a A	0,51 c B	
LP15	0,48 a A	0,38 a A	3,75 a A	1,44 a B	
LP17	0,49 a A	0,31 b B	3,72 a A	1,45 a B	
LP22	0,55 a A	0,31 b B	3,85 a A	1,05 b B	
LP25	0,46 a A	0,42 a A	3,41 a A	1,18 b B	
LP28	0,55 a A	0,41 a A	3,95 a A	1,97 a B	
CV(%)	28,41		16,64		
Experimento 4		Hipocótilo (cm)		Radícula (cm)	
Tratamentos	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	Sem <i>Pythium</i>	Com <i>Pythium</i>	
Controle	0,88 a A	0,56 a B	4,92 b A	0,97 b B	
LP44	0,76 a A	0,56 a B	5,26 a A	1,54 a B	
LP47	0,99 a A	0,53 a B	4,47 b A	1,71 a B	
Ps864C	0,80 a A	0,44 a B	5,23 a A	1,02 b B	
Ps866B	0,88 a A	0,59 a B	4,99 b A	1,32 b B	
Ps871B	0,78 a A	0,55 a B	5,47 a A	1,18 b B	
CV(%)	20,66		13,02		

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de significância, pelo teste Scott-Knott. Letras minúsculas comparam médias na vertical e maiúsculas, na horizontal.

quatro foram identificados como produtores de substâncias indólicas: MP1, Ps21A, Ps864C e Ps871B (Tabela 1).

No segundo experimento realizado, todos os tratamentos com o patógeno e os antagonistas tiveram massa de matéria seca da parte aérea menor do que o tratamento sem inóculo, mas, mesmo assim, os tratamentos com as bactérias resultaram em valores maiores que o tratamento apenas com *P. aphanidermatum* (Figura 2A). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável matéria seca de raízes (Figura 2B).

Quanto às notas conferidas às plantas dos experimentos *in vivo*, cujos resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (5% de probabilidade), não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos (dados não apresentados).

Em resumo, houve aumento da matéria seca da parte aérea dos

tratamentos com os isolados LP15, MP1, Ps21A e Ps864C em relação ao controle sem inoculação com o patógeno (Figura 1). Desses quatro isolados, os três últimos produzem AIA *in vitro* (Tabela 1), o que pode ser uma explicação, pelo menos parcial, da promoção do crescimento. A inoculação com os isolados LP17, LP 22, LP25, LP28, LP44 e LP47 resultou em maior massa da parte aérea das plantas em relação às apenas com o patógeno (Figura 2). Isso indica promoção do crescimento, no primeiro caso, e diminuição do efeito do patógeno, no segundo caso. Aliás, dos seis isolados que tiveram efeito sobre o patógeno, quatro (LP25, LP28, LP44 e LP47) produziram HCN nos testes *in vitro*. Com relação às raízes, houve promoção do crescimento por quatro isolados (MP1, Ps864C, Ps866B e Ps871B) (Figura 1B).

Desses isolados todos, MP1 e Ps864C tiveram efeito tanto sobre a matéria seca da parte aérea quanto a das raízes, sugerindo promoção

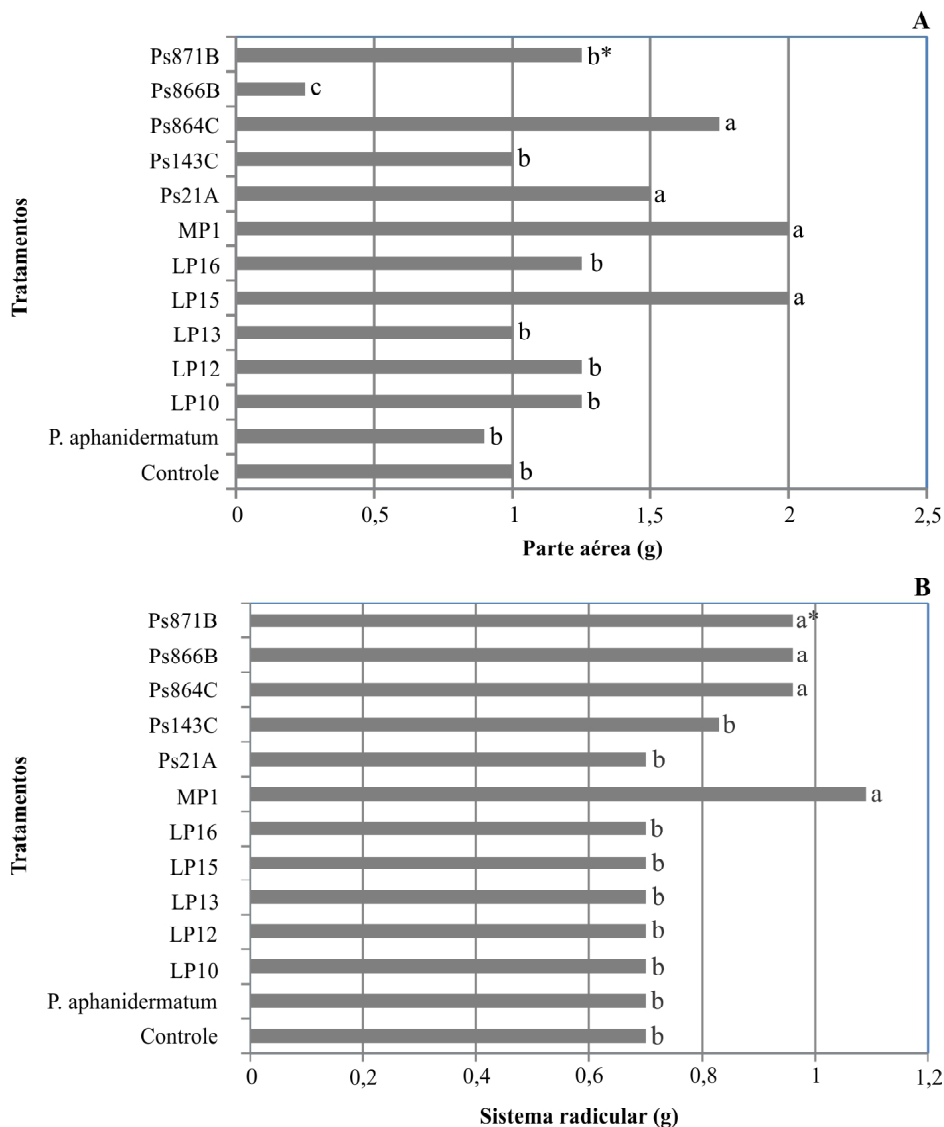


Figura 1. Massa de matéria seca (g) da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plantas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. e cultivadas em sistema hidropônico infestado com *Pythium aphanidermatum*. Experimento 1. * Médias de 4 repetições, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

do crescimento, mas não controle do patógeno. Isso é coerente com o fato de que ambos produziram substâncias indólicas. Quanto ao efeito sobre a manifestação da doença, a maioria dos isolados que resultaram em menor podridão das raízes foram produtores de HCN.

A forma pela qual ocorre o controle do patógeno nem sempre é elucidada, podendo haver mais de um mecanismo envolvido. Os estudos mostram que isolados de *Pseudomonas* e zoósporos de *Pythium* competem por carbono e nitrogênio na raiz de plantas de pepino, cultivado em sistema hidropônico, e que a germinação de zoósporos diminui quando as plantas são tratadas com rizobactérias (30). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a produção de AIA e HCN pelas rizobactérias pode ter beneficiado o desenvolvimento das plantas na presença do patógeno, tanto nos experimentos *in vitro* quanto nos *in vivo*.

Em que pese a presença do patógeno ter sido confirmada no sistema hidropônico, no primeiro experimento as raízes não ficaram escuras como esperado em consequência da infecção por *P. aphanidermatum*. Assim, o patógeno deve ter causado apenas sintomas subclínicos nas

plantas, comuns quando sintomas como escurecimento e podridão radicular não são observados e a planta tem aspecto visual aparentemente sadio (24, 26, 27). No segundo experimento, as plantas tratadas somente com o patógeno tiveram menor massa de matéria seca tanto em relação ao controle quanto em relação aos tratamentos que incluíram a inoculação do patógeno e das bactérias, conjuntamente.

Neste estudo, 17 isolados foram testados *in vitro* e em experimentos em casa-de-vegetação e 6 deles (LP17, LP22, LP25, LP28, LP44 e LP47) promoveram controle de *P. aphanidermatum* nas duas condições. Correspondência entre os resultados obtidos tanto em testes *in vitro* como *in vivo* também foi observada em estudos conduzidos por Gravel et al. (10), que selecionaram isolados de *Pseudomonas* spp. com potencial para controle de espécies de *Pythium* em plântulas de tomate.

No primeiro experimento *in vivo*, o patógeno não interferiu na produção de matéria seca das raízes e na parte aérea das plantas, mas as tratadas com os isolados LP15, MP1, Ps864C e Ps21A tiveram maior massa de matéria seca da parte aérea e dois deles, MP1 e Ps864C,

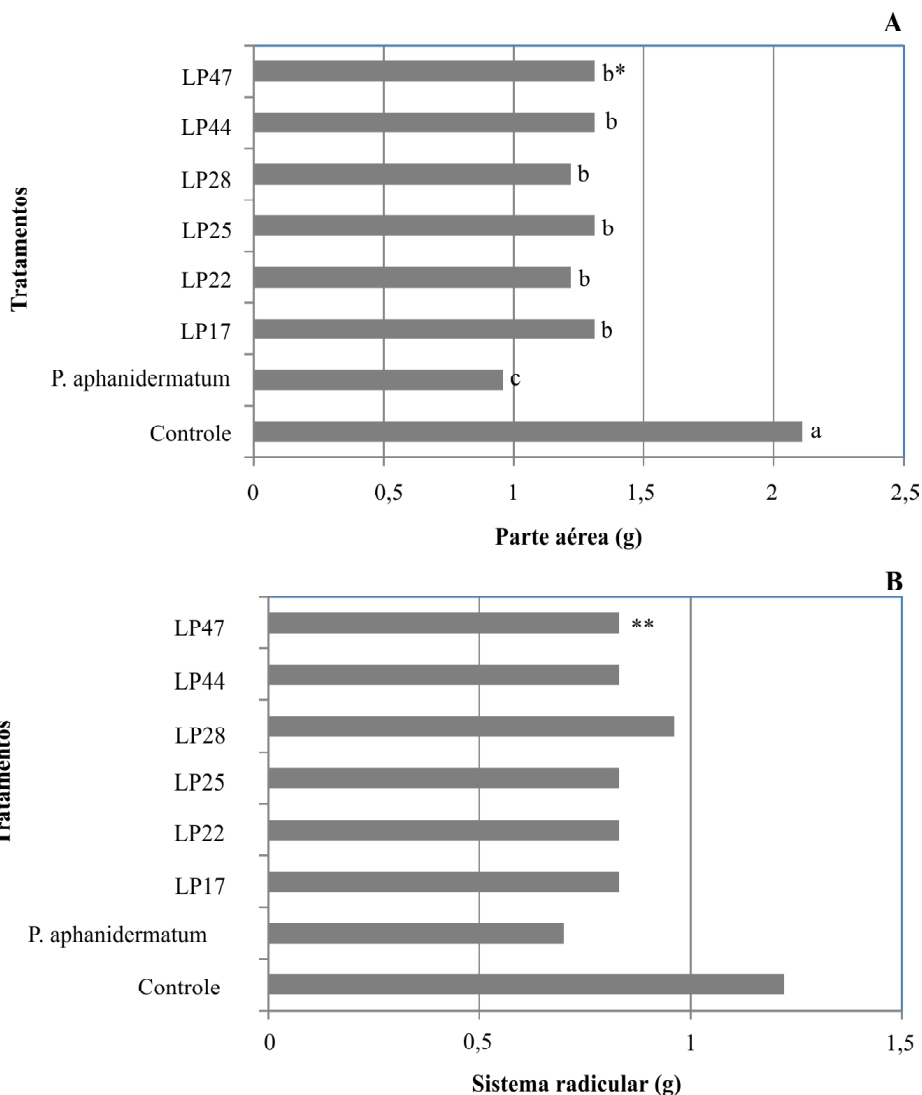


Figura 2. Massa de matéria seca (g) da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plantas de alfaca tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. e cultivadas em sistema hidropônico infestado com *Pythium aphanidermatum*. Experimento 2. * Médias de 4 repetições, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

também tiveram efeito benéfico significativo sobre a matéria seca de raízes em relação ao tratamento controle. Nos experimentos *in vitro* esses isolados, exceto Ps864C, foram responsáveis pelo menor dano causado pelo patógeno, mas não promoveram o crescimento das plantas de alfaca nos tratamentos sem o patógeno.

No total, seis isolados de *Pseudomonas* sp. foram eficientes na redução dos danos causados por *P. aphanidermatum*, em condições *in vitro* e *in vivo* em sistemas hidropônicos. Portanto, o método de seleção *in vitro* pode ser utilizado como uma primeira etapa no processo de seleção de rizobactérias para o controle de *P. aphanidermatum* em sistemas hidropônicos ou outros estudos relativos entre a interação de rizobactérias e *P. aphanidermatum*. Os testes realizados *in vitro* são mais fáceis e rápidos e permitem que um grande número de isolados seja testado em um curto espaço de tempo, mas não excluem a necessidade de realização de experimentos complementares em sistemas hidropônicos.

Este estudo é provavelmente o primeiro no Brasil que mostrou que isolados de rizobactérias obtidos em condições brasileiras têm potencial para serem aplicados em sistemas hidropônicos e fornecerem

uma ferramenta a mais aos produtores para o manejo de podridões radiculares de alfaca causadas por *P. aphanidermatum* nesses sistemas. No presente trabalho, os experimentos desenvolvidos em sistemas hidropônicos constituíram-se, na verdade, em formas de cultivo muito semelhantes à do produtor.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente produzem metabólitos que beneficiam o crescimento de plantas de alfaca. Os testes *in vitro* – nos quais as plântulas são expostas diretamente ao patógeno – podem ser usados como uma forma mais expedita para avaliar a interação *P. aphanidermatum* e rizobactérias. Os isolados testados têm potencial para controle biológico de *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento de plantas de alfaca cultivadas em sistema hidropônico.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa de mestrado outorgada ao primeiro autor e pelo auxílio à pesquisa concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoun, H.; Beauchamp, C. J.; Goussard, N.; Chabot, R. & Lalande, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Crawley, v.204, p.57-67, 1998.
- Arora, N. K.; Khare, E.; Hoon Oh, J.; Kang, S. K.; Maheshwari, D. K. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Londres, v.24, p.581-585, 2008.
- Bakker, A.W.; Schippers, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonads* spp. mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v.19, p.451-457, 1987.
- Bernardes, F.S.; Patrício, F.R.A.; Santos, A.S.; Freitas, S.S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, p.115-121, 2010.
- Bric, J.M.; Bostock, R.M.; Silverston, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.
- Coelho, L.F.; Freitas, S.S.; Melo, A.M.T.; Ambrosano, G.M.B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p. 1413-1420, 2007.
- Corrêa, E.B.; Bettiol, W.; Sutton J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica** Botucatu, v.36, n.4, p. 275-281, 2010
- Dey, R.; Pal, K.K.; Bhatt, D.M.; Chauhan, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promotion rhizobacteria. **Microbiological Research**, Pavia, v.159, p.371-394, 2004.
- Freitas, S.S.; Vildoso, A. Rizobactérias e promoção de crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28 n.6, p.987-994, 2004.
- Furlani, P.R.; Silveira, L.C.P.; Bolonhezi, D.; Faquin, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Boletim Técnico 180, IAC, Campinas, 1999. 52p.
- Gravel, V.; Martinez, C.; Antoun, H.; Tweddell, R.J. Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. **Biocontrol**, Dordrecht, v.50, p.771-786, 2005.
- Gravel, V.; Antoun, H.; Tweddell, R.J. Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v.119, p.457-462, 2007.
- Gray, E.J.; Smith, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane v.37, p.395-412, 2005.
- Hassan, M.N.; Afghan, S.; Hafeez, F.Y. Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. **Pest Management Science**, v.67, p.1147-1154, 2011.
- Khan, A.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and Root Rot in Peppers Grown in Small-scale Hydroponic Troughs. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, n.6, p.615-630, 2003.
- Luz, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.1-49, 1996.
- Marques, A.P.G.C.; Pires, C.; Moreira, H.; Rangel, A.O.S.S.; Castro, P.M.L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.42, p.1229-1235, 2010.
- Mehnaz, S.; Kowalik, T.; Reynolds, B.; Lazarovits, G. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.42, p.1848-1856, 2010.
- Ohse, S.; Dourado-Neto, D.; Manfron, P.A.; Santos, O.S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.181-185, 2001.
- Owen-Going, N.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.25, n.2, p.155-167, 2003.
- Patekoski, K.S.; Pires-Zottarelli, C.L.A. Patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* a alface cultivada em hidroponia e seu biocontrole com *Trichoderma*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.8, p.805-810, 2010.
- Pedrinho, E.A.N.; Galdino Júnior, R.F.; Campanharo, J.C.; Alves, L.M.C.; Lemos, E.G.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoaldas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v.69, n.4, p.905-9011, 2010
- Rahimian, M.K.; Banihashemi, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucurbit seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Reporter**, St. Louis, v.63, n.8, p.658-661, 1979.
- Rodrigues, L.R.F. **Técnicas de Cultivo Hidropônico e de Controle Ambiental no Manejo de Pragas, Doenças e Nutrição Vegetal em Ambiente Protegido**. Jaboticabal: Unesp, 2002. 762p.
- Santana, L.R.R.; Carvalho, R.D.S.; Leite, C.C.; Alcântara, L.M.; Oliveira, T.W.; Rodrigues, B.M. Qualidade física, microbiológica e paratológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.264-269, 2006.
- Stanghellini, M.E.; Kronland, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n.11, p. 1053-56, 1986.
- Sutton, J.C.; Sopher, C.R.; Owen-Going, T.N.; Liu, W.; Grodzinski, B.; Hall, J.C.; Benchimol, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.4, p.307-321, 2006.
- Teixeira, L.D.; Zottarelli, C.L.A.; Kimati, H. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.221-226, 2006.
- Utkhede, R.S.; Lévesque, C.A.; Dinh D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, p.138-144, 2000.
- Weyens, N.; Van Der Lelie, D.; Taghavi, S.; Newman, L.; Vangronsveld, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.10, p.591-598, 2009.
- Voisard, C.; Keel, C.; Hass, D.; Defago, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO Journal**, Alemanha, v.8, 352-358, 1989.
- Zhou, T.; Paulitz, T.C. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane-treated cucumber roots. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.872-876, 1993.