



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

GABRIELA QUEIROZ PELZER

**MECANISMOS DE CONTROLE DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM TOMATEIRO MEDIADOS POR
RIZOBACTÉRIAS**

BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2010

GABRIELA QUEIROZ PELZER

**MECANISMOS DE CONTROLE DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM TOMATEIRO MEDIADOS
POR RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Orientador: Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Boa Vista
Roraima - Brasil
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

P381m Pelzer, Gabriela Queiroz.
Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias / Gabriela Queiroz Pelzer. – Boa Vista, 2010.
64 f.: il.
Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1 – *Sclerotium rolfsii*. 2 – Agricultura. 3 – Tomate.
4 – Fixação biológica de nitrogênio. 5- Controle biológico I - Título. II – Vieira, Bernardo de Almeida Halfeld (orientador).

GABRIELA QUEIROZ PELZER

**MECANISMOS DE CONTROLE DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM TOMATEIRO MEDIADOS
POR RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Aprovada: 02 de Junho de 2010

Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Orientador - Embrapa Roraima

Dr^a. Kátia de Lima Nechet
Co-orientadora - Embrapa Roraima

Prof^a. Dr^a. Liamara Perin
IFRR

Prof. Dr. Jerri Édson Zilli
Embrapa Roraima

Prof. Dr. Jefferson Fernandes do Nascimento
UFRR

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, meus queridos pais
Denice, Daniel e Cezar,
Aos meus irmãos Gilfredo, Igor, Illo, Caio e
Augusto,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida;

À CAPES, pela concessão do programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal de Roraima;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal de Roraima pela oportunidade da conquista deste novo patamar acadêmico, enriquecendo minha vida profissional;

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou a condução deste trabalho;

À Embrapa Roraima pela concessão da estrutura e materiais que possibilitaram a execução dos experimentos;

Ao meu orientador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira e a minha co-orientadora Dr^a.Kátia de Lima Nechet, pela excelente orientação, companheirismo, amizade e ensinamentos que foram concedidos e que nunca serão esquecidos;

Aos pesquisadores da Embrapa Roraima e IFRR, Dr. Jérri Zilli e Dra. Liamara Perin pelas sugestões e conhecimentos repassados;

Aos companheiros dos laboratórios de Fitopatologia, Microbiologia e Biotecnologia da Embrapa Roraima, ao técnico Giovanni Souza, a técnica Aline Melo, a mestre Rosianne Silva, a doutoranda Hyana Lima, ao pós-doutorando Paulo Ivan Fernandes Júnior, as estagiárias Isabel Diniz e Stefanny Martins, aos estagiários Alexandre Baraúna, Washington Luís e a técnica do laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente Márcia Parma, pela amizade, carinho, companheirismo e ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos, em especial, Luana Mesquita, Lidiany Barbosa, Denysson Amorim, Gabriela Almeida, Marina Keiko, Maria Elena Ivanoff, Rutinéia Nobre, Deisy Golfetto, Ivonilde Leitão, Carlos Terossi, Arnaud Lira, Vera Silveira, Manuel Tavares, Maria Helena Veronese, Cícero Beserra, Lúcia Stock, Salete Paiva, Pollyanne Queiroz e Velma Barros, pela amizade, incentivo e companheirismo;

Aos doutores Jean Luiz Simões de Araújo e Itamar Soares de Melo, pelo apoio na identificação das rizobactérias;

Aos professores do curso de Mestrado em Agronomia pelos ensinamentos proporcionados;

Ao meu namorado Earlle Santiago pelo carinho, paciência e incentivo para realização deste sonho;

Aos meus familiares pelo amor e apoio recebido nos momentos de dificuldade.

Muito obrigada à todos.

BIOGRAFIA

GABRIELA QUEIROZ PELZER, filha de Cezar Camillo Alves Pelzer e Denice Queiroz da Silva, nasceu em 22 de julho de 1983, na cidade de Boa Vista, no Estado de Roraima.

Concluiu o ensino médio na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio Ayrton Senna da Silva no ano de 2001, em Boa Vista, Roraima.

Em março de 2002 ingressou no curso de bacharelado em Agronomia pela Universidade Federal de Roraima, concluindo o curso em julho de 2007.

Em 2007 trabalhou na Secretaria Municipal de Desenvolvimento Agrícola como extensionista.

Em 2009 até o presente momento, trabalha na Superintendência de Agricultura Familiar e Agronegócios, na Secretaria Municipal de Planejamento, Finanças e Economia, como técnica municipal na área de extensão rural.

Em março de 2008 foi admitida no curso de Mestrado em Agronomia do Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Roraima, submetendo-se à defesa da dissertação em 02 de Junho de 2010.

“A natureza é racional e revelará seus segredos àqueles que aprenderem a ler e a entender sua linguagem.”

George – Louis Leclero Conde de Buffon

PELZER, Gabriela Queiroz. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias**. 2010. 64p. Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo elucidar quais mecanismos de antagonismo são responsáveis pelo biocontrole da murcha-de-esclerócio e que fatores estão envolvidos na promoção de crescimento em tomateiro por meio de rizobactérias. Os testes foram realizados *in vivo* e *in vitro*, em que se verificaram: a capacidade de produção de enzimas líticas, antibiose por meio de compostos voláteis e difusíveis, colonização de raízes, produção de sideróforos, metabolismo de carbono, produção de ácido indol acético, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e promoção de crescimento do tomateiro em condições de casa-de-vegetação. Os resultados demonstram que a competição por ferro e antibiose são mecanismos que explicam a capacidade de biocontrole da murcha-de-esclerócio exercido por rizobactérias, assim como a produção de auxinas e a fixação biológica de nitrogênio a promoção do crescimento. Também são demonstradas limitações do controle biológico, pela capacidade de competição depender do isolado de *Sclerotium rolfsii* e, da antibiose, da composição nutricional do meio de crescimento.

Palavras-chave: *Sclerotium rolfsii*, antibiose, sideróforos, controle biológico, *Solanum lycopersicum*, auxinas, fixação biológica de nitrogênio.

PELZER, Gabriela Queiroz Pelzer. **Control mechanisms of southern blight and growth promotion on tomato mediated by rhizobacteria.** 2010.64p. M.S. Dissertation in Agronomy – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

ABSTRACT

This research was aiming to elucidate the antagonism mechanisms responsible for the biocontrol of southern blight and the elements involved in growth promotion in tomato by rhizobacteria. The experimental assays were performed *in vivo* and *in vitro*, and the following characteristics evaluated: production of lytic enzymes, antibiosis by volatiles and diffusible compounds, root colonization, siderophores production, carbon sources metabolism, indole acetic acid production, nitrogen fixation, calcium phosphate solubilization and tomato growth promotion in greenhouse conditions. The results indicate that iron competition and antibiosis are mechanisms that explain the biocontrol capability of southern blight by rhizobacteria just as auxin production and biological nitrogen fixation in growth promotion. Limitations in biological control are demonstrated because the competition capability is strain-specific for *Sclerotium rolfsii* as well antibiosis for nutritional composition of growth media.

Keywords: *Sclerotium rolfsii*, antibiosis, siderophores, biological control, *Solanum lycopersicum*, auxins, biological nitrogen fixation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	15
2.2	MURCHA-DE-ESCLERÓCIO (<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.).....	16
2.3	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR RIZOBACTÉRIAS E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.....	17
2.4	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO.....	20
2.4.1	Sideróforos.....	21
2.4.2	Compostos Antimicrobianos.....	22
2.4.3	Enzimas Quitinases e β -1,3-Glucanases.....	23
2.4.4	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	24
2.4.5	Ácido indol acético (AIA).....	25
2.4.6	Solubilização de fosfato de cálcio.....	26
3	ARTIGO: MECANISMOS DE CONTROLE DA MURCHA-DE- ESCLERÓCIO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM TOMATEIRO MEDIADOS POR RIZOBACTÉRIAS.....	28
3.1	RESUMO.....	28
3.2	ABSTRACT.....	28
3.3	INTRODUÇÃO.....	30
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS.....	72
	APÊNDICES.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.5.2	Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono pelos isolados de rizobactérias selecionadas para o controle da murcha-de-esclerócio, por meio do kit Biolog [®] GN2.....	45
Tabela 3.5.3	Capacidade das rizobactérias quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio (SFC).....	49
Tabela 3.5.4	Efeito de rizobactérias na altura (cm), massa seca raiz (g), massa seca parte aérea (g) e massa seca total de tomateiros em diferentes parâmetros indicadores de promoção de crescimento, em condições de casa-de-vegetação.....	50
Tabela 3.5.5	Efeito das rizobactérias selecionadas no crescimento da parte aérea e radicular de plântulas de tomateiro <i>in vitro</i> , em meio agar-água.....	51
Tabela 3.5.6	Taxa de crescimento micelial (cm) de três isolados de <i>Sclerotium rolfsii</i> por rizobactérias selecionadas, por meio da difusão de compostos em meio de cultura.	52
Tabela 3.5.8	Efeito da produção de sideróforos por rizobactérias na redução da taxa de crescimento micelial (cm) de três isolados de <i>Sclerotium rolfsii</i> , em meio B de King, com e sem suplementação por sulfato ferroso.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.5.1.	Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, comparadas com bactérias presentes no banco de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas no programa BLAST e agrupadas pelo método UPGMA no programa MEGA 4.1.....	43
Figura 3.5.7	Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos pelas rizobactérias 31223 (A), 32238 (B), 33282 (C) e 38291 (D), com 2 repetições, em que os microtubos localizados acima correspondem ao meio suplementado por 2 μM de $\text{Fe}^{2+}.\text{mL}^{-1}$ e os localizados abaixo sem suplementação.....	53

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura de grande importância econômica, sendo uma das mais cultivadas e consumidas, devido a inúmeros fatores, dentre eles a versatilidade quanto ao seu uso, o valor nutritivo e o valor comercial (FERNANDES et al., 2007).

As pragas e doenças são importantes limitações para a obtenção de altas produtividades, necessitando de controle preventivo que muitas vezes elevam o custo de produção, causam desequilíbrios ecológicos e contaminações tanto do meio ambiente quanto do próprio homem (HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

Entre as doenças incidentes na cultura, a murcha-de-esclerócio causada pelo fungo de solo *Sclerotium rolfsii* é uma das enfermidades que afetam regiões tropicais (DUARTE et al., 2006). Este fitopatógeno é polífago e tem mais de 500 espécies botânicas hospedeiras (MAFIA et al., 2007), sendo de difícil controle devido a formação de escleródios, estruturas de resistência características do patógeno, que permanecem viáveis no solo por longos períodos mesmo sob condições adversas (BLUM et al., 2003). Por esses motivos, o controle da doença é difícil, principalmente quando a densidade de inóculo é alta, devido à capacidade de competição saprofítica do patógeno (DANTAS et al., 2002). A disseminação do patógeno ocorre por meio da água de irrigação, movimento do solo, implementos agrícolas, estercos, sementes ou planta infectada (PÁDUA et al., 2007).

O controle do *S. rolfsii* ocorre por intermédio de práticas preventivas, incluindo rotação de culturas, aração profunda, dentre outras e também por controle biológico e o controle químico (KIMATI et al., 2005). Os agroquímicos possuem diversos efeitos prejudiciais, podem causar danos ao ambiente, à saúde humana e animal; tais como a ocorrência de resíduos em alimentos, contaminação do solo e da água e intoxicações (JESUS JÚNIOR et al., 2007).

Para o controle químico desta doença no tomateiro, é recomendado apenas o quintozeno (cloroaromático), porém seu ingrediente ativo (AGROFIT, 2010), não apresenta uma eficiência satisfatória. Neste contexto, o controle biológico representa uma das práticas culturais que pode complementar as medidas de controle da murcha-de-esclerócio (BLUM et al., 2003).

Esse tipo de controle vem se difundindo com perspectivas no manejo integrado de doenças, por meio do emprego de microrganismos para o controle biológico de doenças de plantas, trazendo benefícios tanto para o produtor como para o meio ambiente, onde a contaminação pelo uso de agrotóxicos é minimizada.

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) estão entre os microrganismos mais promissores no biocontrole de doenças, pois colonizam as plantas sem prejudicar o seu desenvolvimento e nem ocasionar doenças, atuando direta ou indiretamente na promoção de crescimento vegetal (MARIANO et al., 2004).

Os gêneros bacterianos que mais se destacam são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Arthrobacter* (SPAEPEN et al., 2009), *Streptomyces* (FARIAS et al., 2009), *Frankia*, *Bradyrhizobium* (PEREIRA et al., 2008), *Azotobacter* (SANTOS, 2009), *Agrobacterium*, *Rhizobium* (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999), dentre outras.

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. vêm sendo empregados no controle biológico, apresentando grande capacidade competitiva com alguns fungos fitopatogênicos, dentre eles *Sclerotium rolfsii* (LOHMANN et al., 2007; PÁDUA et al., 2007) e *Rhizoctonia solani* (SHALINI e KOTASTHANE, 2007).

Os principais mecanismos de antagonismo direto produzidos por várias PGPR que atuam no biocontrole de fitopatógenos são sideróforos, cianetos, enzimas desintoxicantes, antibióticos e enzimas líticas (BOTELHO et al., 2006).

Porém, diferentes mecanismos também são responsáveis pela promoção de crescimento vegetal, dentre eles, podemos citar a indução de resistência à doenças, a produção de substâncias como antibióticos, sideróforos e fitormônios, a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfatos (VESSEY, 2003; MARIANO et al., 2004; KUSS, 2006; FREITAS, 2007; CHAIHARN et al., 2008).

No presente trabalho, foram utilizadas quatro rizobactérias selecionadas para o controle de *S. rolfsii* na cultura do tomate, isoladas da rizosfera de tomateiros sadios coletados no estado de Roraima (BARBOSA, 2009), com o objetivo de elucidar quais mecanismos são responsáveis pelo controle da doença, identificar e caracterizar as rizobactérias e verificar a capacidade de promoção de crescimento vegetal pelas mesmas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro é uma das solanáceas mais consumidas no mundo, sendo utilizado *in natura* ou processado industrialmente, apresentando grande importância econômica (FERNANDES et al., 2007), sendo mundialmente uma das mais cultivadas por área com alto valor comercial (CARVALHO et al., 2002). Esta cultura originou-se nas regiões andinas da América do Sul compreendida entre o Equador, Chile e Peru (KRONKA, 2004, ALVARENGA, 2004), sendo introduzida no Brasil no século XX no estado de Pernambuco (DUVAL, 2003). Possui ampla versatilidade quanto ao seu uso e alto valor nutritivo (KRONKA, 2004), destacando-se na economia brasileira por gerar inúmeros empregos por meio de seu cultivo (CARVALHO et al., 2003).

Entretanto, um dos entraves para obtenção de altas produtividades são as constantes incidências de pragas e doenças às quais esta cultura é suscetível. Desse modo, o uso de agroquímicos preventivos são constantes, tornando esta atividade onerosa, aumentando os riscos de contaminação do meio ambiente e do próprio ser humano (GOMES, 2005), podendo até mesmo inviabilizar o investimento.

Em Roraima, as dificuldades encontradas para o seu cultivo está relacionada com as exigências da cultura, incidências de pragas e doenças, uso de variedades não adaptadas à região, tratos culturais e adubações inadequadas, fatores esses que contribuem para o insucesso da cultura. Como consequência, a produção não atende a demanda, apresentando, conforme os últimos dados obtidos em 1998, uma área plantada de 31,47 ha, com uma produção de 472.057 kg e produtividade de 15 t/ha (LUZ et al., 2002).

O tomateiro é afetado por uma grande diversidade de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, que comprometem a produção (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Dentre as principais enfermidades que ocorrem no Brasil encontra-se a murcha-de-esclerócio, causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii*.

2.2 MURCHA-DE ESCLERÓCIO (*Sclerotium rolfsii* Sacc.)

A murcha-de-esclerócio é uma doença de importância econômica que tem como agente causal o fungo de solo *Sclerotium rolfsii* Sacc., cuja fase teleomórfica é *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu e Kimbrough. O patógeno pertence ao reino Fungi, divisão Basidiomycota, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Atheliales e a família Atheliaceae (INDEX FUNGORUM, 2010; NCBI, 2010).

Este fitopatógeno possui ampla gama de hospedeiros, sendo mais de 500 espécies botânicas suscetíveis (MAFIA et al., 2007), destacando-se as culturas do amendoim, feijão-caupi (KIMATI et al., 2005), soja (BLUM e RODRIGUEZ-KÁBANA, 2006), pimentão (SERRA e SILVA, 2005), feijão comum (DANTAS et al., 2002; KIMATI et al., 2005), tomate, cajueiro, melancia, milho, beterraba (ALMEIDA, 1987), dentre outras.

Esta doença ocasiona podridão do colo e haste da planta, podridão das raízes, sintomas de murcha e tombamento em plântulas (SERRA e SILVA, 2005), bem como o apodrecimento de frutos, apresentando em ambientes favoráveis o aparecimento de micélio branco no qual são formados os escleródios. Estas estruturas de resistência, representa um dos fatores que contribuem para sua sobrevivência (MARTINS et al., 2003), pois os mesmos podem permanecer viáveis por mais de cinco anos; sendo capazes também de sobreviver em restos culturais, mesmo de plantas não-hospedeiras (KIMATI et al., 2005).

A alta capacidade de persistência no solo (BLUM et al., 2003) e competição saprofítica (DANTAS et al., 2002) dificulta seu controle, podendo o mesmo se desenvolver sob condições de alta umidade e temperatura (25 a 35°C), sendo altamente exigente em oxigênio (KIMATI et al., 2005), afetando principalmente regiões tropicais (DUARTE et al., 2006).

Sua disseminação ocorre pelo movimento do solo, água de irrigação, esterco, sementes ou planta infectada e implementos agrícolas (ALVARENGA, 2004; PÁDUA et al., 2007).

E desta forma algumas práticas culturais são preconizadas como medidas de controle, como: realização de aração profunda, controle de plantas daninhas,

rotação de cultura, tratamento do solo com agroquímicos, controle biológico, dentre outras (BLUM et al., 2003; KIMATI et al., 2005).

Para o controle químico no tomateiro, existe apenas um fungicida recomendado, tendo este como ingrediente ativo o quintozeno (cloroaromático) (AGROFIT, 2010). Entretanto, em trabalho realizado com outro princípio ativo por Duarte et al. (2006) demonstrou-se a eficácia do fungicida tebuconazol na concentração de 0,05% do produto comercial, na inibição do crescimento de colônias e na germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*, com fins de controle da podridão das estacas em pimenteira-do-reino.

A solarização e incorporação de resíduos orgânicos ao solo são métodos de controle que apresentam resultados significativos na supressão do fitopatógeno (SANTOS et al., 2009). Na compostagem, comunidades de actinomicetos associadas atuam na supressão de *S. rolfsii* por meio de ação conjunta, sendo capazes de parasitar os escleródios (DANON et al., 2010).

Os agentes biocontroladores de *S. rolfsii*, possuem diferentes tipos de mecanismo de ação. Espécies do fungo *Trichoderma* spp. produzem enzimas líticas que degradam as paredes das células fúngicas (MELO, 1991), e deste modo são capazes de suprimir a doença na cultura da soja (LOHMANN et al., 2007).

Entretanto, uma ação combinada de biocontroladores podem otimizar o controle da doença. *Trichoderma viride* e *Pseudomonas fluorescens* quando aplicados juntos aumentam a capacidade de controle de *S. rolfsii*, sendo a produção de cianeto de hidrogênio (HCN) e antibióticos um dos mecanismos de biocontrole utilizados pelos isolados de *Pseudomonas fluorescens* (MANJULA et al., 2004). A eficiência no controle de *S. rolfsii* também foi demonstrada pela aplicação conjunta de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. (REMUSKA e PRIA, 2007).

2.3 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR RIZOBACTÉRIAS E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

O solo, quando se encontra em equilíbrio, é um ambiente onde as bactérias compõem a maior comunidade de microrganismos que, por sua vez, influenciam na fertilidade do solo (STAMFORD et al., 2005), propiciando diversas transformações

químicas, físicas e biológicas, destacando-se processos de ciclagem de nutrientes, sendo estes de fundamental importância na agricultura (SOTTERO, 2003).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal residem em plantas epifiticamente ou endofiticamente, sem prejudicar seu desenvolvimento, nem ocasionar doenças, além de fazerem parte de diversos produtos biológicos que já são comercializados no mercado, atuando diretamente e indiretamente na promoção de crescimento vegetal (MARIANO et al., 2004). Estas influenciam no crescimento vegetal por meio da indução de resistência à doenças, produção de substâncias como antibióticos, sideróforos, fitormônios, bem como por meio da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos, sendo estes mecanismos pelos quais são disponibilizados certos nutrientes às plantas (VESSEY, 2003; MARIANO et al., 2004; KUSS, 2006; FREITAS, 2007; CHAIHARN et al., 2008).

Dentre estes microrganismos, as rizobactérias que participam da promoção de crescimento vegetal possuem o solo como habitat natural, e exercem inúmeros benefícios às plantas (KLOEPPER e SCHROTH, 1978), sendo conhecidas como PGPR (“Plant Growth Promotion Rhizobacteria”). Estas sofrem influência da raiz e se associam a diversas plantas, podendo manter uma relação não simbiótica com algumas espécies (SOTTERO, 2003).

Os gêneros bacterianos que fazem parte deste grande grupo são *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Arthrobacter* (SPAEPEN et al., 2009). Os principais grupos pertencem aos gêneros *Pseudomonas* (SPAEPEN et al., 2009), que possui versatilidade nutricional e habilidade de crescer em ampla variedade de ambientes e substratos (FERREIRA et al., 2009) e *Bacillus* sp. (SPAEPEN et al., 2009), sendo que este último apresenta maior período de viabilidade quando comparado com as *Pseudomonas* sp. devido à capacidade de produção de endósporos (CIPRIANO, 2009). Entretanto, produtos a base de *Trichoderma* têm sido eficientes na redução de incidência de tombamento em plantas ocasionadas por *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*, sendo a severidade da doença reduzida (POMELLA e RIBEIRO, 2009).

Muitos fitopatógenos como *Aphanomyces* spp., *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Thielaviopsis basicola* e *Verticillium* spp. são negativamente

afetados por PGPRs por meio da produção de metabólitos bacterianos, tais como antibióticos, cianeto de hidrogênio (HCN), quelantes de ferro (sideróforos) e degradação da parede celular por enzimas (KLOEPPER et al., 1999).

Porém, uma das limitações existentes quanto ao uso das PGPRs que é frequentemente relatada é a variabilidade dos resultados devido a diversos fatores existentes (FREITAS, 2007), dentre eles, segundo Weller e Zablotowicz (1987), destacam-se problemas de sobrevivência do inóculo ou por condições desfavoráveis para a bactéria colonizar a rizosfera e, conseqüentemente, interagir com a planta.

A microbiolização de sementes por bactérias é um processo que permite a colonização radicular, sendo de grande importância na introdução de agentes biocontroladores, permitindo que os mesmos estejam presentes ainda no processo germinativo, sendo essenciais para o estabelecimento e o desenvolvimento das comunidades microbianas associadas às raízes (HARTHMANN, 2009).

A colonização radicular por bactérias antagonistas permite a interação destas com a planta (WELLER e ZABLOTOWICZ, 1987), além do biocontrole de doenças e promoção de crescimento da planta hospedeira.

O processo de colonização também influencia na sobrevivência de rizobactérias, pois é um pré-requisito para o sucesso do controle biológico (ZHENG e SINCLAIR, 2000).

Os microrganismos ideais para uso no controle biológico devem ter uma boa capacidade de colonização (BETTIOL, 1991), sendo que estes devem apresentar um alto potencial competitivo para se obter sucesso neste processo (COMPANT et al., 2009).

O reconhecimento entre microrganismo e planta se dá por meio da exsudação de compostos presentes nas células radiculares e microbianas, entre eles, polissacarídeos e flavonóides (AGUILAR et al., 1988; KIJINE et al., 1988); que fazem com que as PGPR atinjam a superfície das raízes sendo conduzidas por meio de sua motilidade e quimioatração (BOTELHO et al., 2006).

Entretanto, para que uma rizobactéria seja considerada uma verdadeira PGPR, esta deve apresentar a capacidade de realizar a colonização radicular (MEERA et al., 1995), sendo esta habilidade um importante critério de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (SILVA et al., 2003; MAFIA et al., 2009).

A habilidade de uma rizobactéria em colonizar raízes suprindo-se somente dos exsudados radiculares, constitui uma vantagem, pois permite que esta estabeleça associação desde a emissão da radícula e que esta seja viabilizada por meio de sementes. Esta capacidade pode ser verificada por meio de testes de colonização em ágar-água.

Harthmann (2009) trabalhando com microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola observou alguns benefícios que foram proporcionados com este processo, como o aumento no volume de raízes de plantas, havendo maior absorção de água e nutrientes pela planta, além do incremento na produção de bulbos.

Alguns trabalhos realizados com diferentes culturas também confirmam a promoção de crescimento mediada por rizobactérias, dentre elas, arroz (ASHRAFUZZAMAN, 2009); grão-de-bico (JOSEPH et al., 2007); tomate (NAUE et al., 2008); figueira (SCHAFER et al., 2008); feijão comum (GARCIA, 2008); alface (CIPRIANO, 2009); pepino (LUCON et al., 2008); melancia (SANTOS et al., 2008); entre outras.

2.4 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO

O modo de atuação das rizobactérias como promotoras de crescimento vegetal e biocontroladoras de fitopatógenos ocorre por diferentes mecanismos que operam em ação conjunta ou isoladamente (CORRÊA e BETTIOL, 2009), destacando-se os que agem diretamente no biocontrole e indiretamente na promoção de crescimento, como a produção de enzimas que degradam as células da parede celular como quitinases e β -1,3-glucanases, enzimas que agem conforme a indução de resistência em resposta a um agente elicitador, como as peroxidases, produção de compostos que promovem a antibiose, como antibióticos e cianeto de hidrogênio (HCN), a colonização de raízes que é um importante processo que propicia a competição por nicho e o estabelecimento do biocontrolador nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal, aumentando a densidade populacional do antagonista; a competição por nutrientes por meio da

produção de queladores de ferro denominados sideróforos; e os que agem diretamente na promoção de crescimento e indiretamente no biocontrole, com a solubilização de fosfato de cálcio, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de ácido indol acético (AIA), dentre outros.

No entanto, os principais mecanismos de biocontrole de fitopatógenos produzidos por várias PGPR são sideróforos, cianetos, enzimas desintoxicantes, antibióticos e enzimas líticas (BOTELHO et al., 2006).

2.4.1 Sideróforos

O ferro é o quarto elemento mais abundante que existe na crosta terrestre, entretanto, apenas uma pequena fração encontra-se disponível para os seres vivos, sendo este um elemento que limita o crescimento de diversas formas de vida (SILVEIRA, 2009).

Sideróforos são queladores de ferro altamente eletronegativos sintetizados por certas bactérias e fungos, quando as concentrações deste elemento são baixas no meio em que vivem, sendo posteriormente disponibilizados às células para que sejam utilizados em diversos processos metabólicos, dentre eles a redução do oxigênio para a síntese de ATP (adenosina trifosfato), produzindo energia (DAS et al., 2007). Alguns fungos fitopatogênicos produzem compostos fitotóxicos que também atuam como queladores de ferro (DAS et al., 2007), sendo o sequestro de ferro uma vantagem competitiva de um microrganismo sobre outro (FRAVEL, 1988).

A exigência de ferro pelos fungos cria novas expectativas, em solos que apresentam baixa disponibilidade deste elemento, para o desenvolvimento de compostos antifúngicos (HAAS et al., 2008).

O tipo de sideróforo geralmente ocorre de acordo com gênero da bactéria. Por exemplo, *Burkholderia* spp. produzem ornibactina, *Mycobacterium* spp. produzem micobactina. No entanto existem algumas exceções, onde pioverdina e cepabactina pode ser produzida tanto por *Pseudomonas* spp. quanto por *Burkholderia* spp., e a enterobactina pode ser produzida por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Erwinia* spp. (BULTREYS, 2007).

Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* produzem este metabólito secundário, destacando-se as pioverdinas; que são um dos principais sideróforos produzidos pelas *Pseudomonas* que têm como característica ser fluorescente quando observado em luz ultravioleta, sendo citado como importante no controle biológico de doenças e promoção do crescimento vegetal (BULTREYS, 2007; PRESS et al., 2001).

A detecção da produção de sideróforos pode ser realizada através de ensaios que envolvem colorimetria, sendo este um método amplamente empregado, onde se utiliza o Cromo Azurol S (CAS) como solução indicadora (SCHWYN e NEILANDS, 1987), possibilitando que sejam evidenciadas as bactérias que produzem sideróforos devido à remoção do ferro complexado ao corante (SILVEIRA, 2009) que adquire uma cor que passa do azul para amarelo-alaranjado.

2.4.2 Compostos Antimicrobianos

A antibiose é promovida por meio da produção de compostos antimicrobianos que atuam na supressão de doenças, inibindo o crescimento de fitopatógenos.

Entre os compostos antimicrobianos existentes, podem ser citados antibióticos como fenazinas, fluoroglucinol, pirrolnitrina, pioluteorina (WELLER e THOMASHOW, 1993), fungicidas, nematocidas (SOUSA, 2006) e cianeto de hidrogênio (HCN), sendo a produção destes compostos reguladas por meio de um “quorum-sensing”. Este mecanismo no qual as bactérias se comunicam através de sinalizadores que são pequenas moléculas difusíveis, sendo em Gram-negativas moléculas do tipo N-acilhomoserina lactonas (AHLs) (OLIVEIRA et al., 2003; BOTELHO et al., 2006).

A supressividade do solo por bactérias da espécie *Pseudomonas fluorescens* é realizada pela síntese de antibióticos que atuam no biocontrole (BOTELHO et al., 2006); sendo os gêneros *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Burkholderia* capazes de produzir fenazinas (SPAEPEN et al., 2009).

Entretanto, vale ressaltar que apenas estes tipos de antagonismo direto pela produção de compostos antimicrobianos não são suficientes para a explicação do controle biológico, sendo necessário uma ação concomitante entre o antagonismo

direto, a indução de resistência ou pela ação de ambos mecanismos para que o mesmo seja estabelecido (ROMEIRO e GARCIA, 2009; BETTIOL et al., 2009).

Os agentes biocontroladores também podem atuar por meio de outros mecanismos de antagonismo, como produção de compostos voláteis inibitórios. Estes compostos apresentam baixa massa molecular, podendo pertencer a classes químicas dos alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, compostos de enxofres e terpenos (WHEATLEY, 2002). Os compostos voláteis podem reduzir ou até mesmo inibir a germinação de esporos de diversos fungos (CHUANKUN et al., 2004).

A relação entre microrganismos e compostos voláteis ainda não está totalmente compreendida e muitos compostos ainda continuam sendo identificados (CHUANKUN et al., 2004).

Em trabalho realizado por Wheatley (2002) sobre interações mediadas por voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo, demonstrou-se que dependendo do isolado bacteriano, o crescimento micelial dos isolados fúngicos era estimulado em até 40% ou inibido em até 60%.

2.4.3 Enzimas Quitinases e β -1,3-Glucanases

As enzimas hidrolíticas quitinases e β -1,3-glucanases também são importantes mecanismos de ação de algumas rizobactérias e fungos biocontroladores, que geralmente agem sobre a quitina e o β -1,3-glucano que são constituintes das paredes celulares dos fungos (SANTIN, 2008; POZO et al., 1999), sendo responsáveis pela rigidez e manutenção de sua integridade (SHALINI e KOTASTHANE, 2007).

Estas, por sua vez, são capazes de promover a degradação das paredes celulares de fungos em geral, incluindo os fitopatogênicos (PÁDUA et al., 2007) e quando secretadas por rizobactérias promotoras de crescimento, podem reduzir o crescimento de fitopatógenos presentes na região rizosférica (COMPANT et al., 2009).

Diferentes organismos produzem quitinases, entre eles, fungos, bactérias, plantas superiores, crustáceos e insetos, sendo que nos fungos estas encontram-se

envolvidas no processo de crescimento e diferenciação (FRANCESCHINI et al, 2001).

Isolados bacterianos dos gêneros *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillus* sp., possuem atividades quitinolíticas (SILVA, 2007; HUANG et al., 2005), sendo estes alguns dos principais gêneros produtores desta enzima.

Entretanto, estudos com *Pseudomonas fluorescens* demonstraram que as mesmas são capazes de produzir quitinases e β -1,3-glucanases (NAGARAJKUMAR et al., 2004), bem como espécies do fungo *Trichoderma* spp. (MICHEL ACEVES et al., 2005).

O micoparasitismo de alguns fungos é estimulado pela produção de enzimas líticas, entre elas, a β -1,3-glucanases. Ren et al. (2007) mostraram que um dos mecanismos utilizados pelo fungo antagonista *Coniothyrium minitans* sobre *Sclerotinia sclerotium* se dava pela degradação do ácido oxálico que estava correlacionado com o aumento da produção de β -1,3-glucanases pelo antagonista, estimulando a atividade desta enzima.

2.4.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio compõe cerca de 80% da atmosfera, no entanto, está presente no ar na forma quimicamente inerte, onde poucos organismos são capazes de usufruí-lo, sendo este elemento limitante na produção agrícola (SILVEIRA, 2008).

Outro mecanismo que também está envolvido na promoção de crescimento vegetal é a fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas. Estas possuem a nitrogenase como complexo enzimático, apresentando habilidade em converter, por meio de redução, nitrogênio atmosférico em amônia (KUSS et al., 2007, SABINO, 2007) e incorporando o nitrogênio em suas moléculas orgânicas (SILVEIRA, 2008), que posteriormente será disponibilizado às plantas de forma assimilável, sendo uma alternativa de se obter este elemento, quando o mesmo encontra-se escasso no solo.

Existe uma grande diversidade de plantas que formam este tipo de associação, destacam-se as plantas leguminosas como soja, onde ocorre formação de nódulos e, também, ocorre FBN em plantas não leguminosas, sem formação de

estruturas especializadas, como em plantas de trigo (ROESCH et al., 2005), arroz (SABINO, 2007; KUSS et al., 2008;), cana-de-açúcar (MAGNANI, 2005; PERIN, 2007), sorgo (BERGAMASCHI, 2006); frutíferas como abacaxizeiro (WEBER et al., 2004), bananeira (WEBER e FREIRE, 2003); dentre outras.

Os principais gêneros bacterianos que realizam este tipo de fixação biológica de nitrogênio são: *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Derxia* (BALDANI e BALDANI, 2005).

Dentre as técnicas existentes para a detecção da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, encontra-se um método simples no qual este fenômeno é observado por meio de formação de película, onde as mesmas são crescidas num meio de cultura semi-sólido sem fontes de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995). Neste teste, ocorre formação de película logo abaixo da superfície do meio de cultura, onde ocorre presença de oxigênio, porém em quantidades não tóxicas para a bactéria.

Entretanto, para uma real confirmação deste benefício pode-se utilizar outras técnicas, como a de redução de acetileno, que ocorre pela atividade ambígua da nitrogenase que é capaz de utilizar vários substratos; bem como a amplificação do gene *nifH*, que é um dos genes funcionais mais estudados (BRASIL, 2005).

2.4.5 Ácido Indol Acético (AIA)

Fitormônios são substâncias químicas que em baixas concentrações promovem o crescimento das plantas, influenciando no seu crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular de tecidos (SPAEPEN et al., 2009).

A produção de reguladores de crescimento trazem inúmeros benefícios à planta hospedeira, como a expansão do sistema radicular, que melhora a absorção de água e nutrientes, acentuando sua chance de sobrevivência no ambiente (SILVEIRA, 2008); sendo este um dos mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento vegetal por meio de efeitos estimulatórios.

O AIA pertence ao grupo das auxinas, tendo como precursor de sua biossíntese o triptofano, que se encontra presente nos tecidos vegetais na forma livre ou incorporada (BAUTISTA e GALLARDO, 2008) estimulando as multiplicações

celulares, e promovendo o crescimento vegetal, bem como a atividade da nitrogenase (TIEN et al., 1979).

A produção deste regulador de crescimento pelas bactérias pode ter surgido devido a sua importância na interação entre planta-bactéria, pois o mesmo não atua nas células bacterianas como um hormônio (SILVEIRA, 2008). Não estando ainda esclarecido como se dá a promoção de crescimento vegetal por meio da produção de AIA pelas bactérias (PATTEN e GLICK, 2002).

Este fitormônio produzido pelas bactérias, quando se encontra em concentrações baixas atua estimulando o crescimento, e quando o mesmo apresenta-se em altas concentrações, prejudica o desenvolvimento radicular (SILVEIRA, 2008).

A maioria das bactérias diazotróficas são capazes de produzir este fitormônio, dentre elas destacam-se os gêneros bacterianos *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (RADWAN et al., 2005).

Algumas espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, dentre outros, demonstraram evidências quanto sua promoção de crescimento, sendo atribuídas a influências exercidas por este regulador de crescimento (VESSEY, 2003; SPAEPEN et al., 2009).

2.4.6 Solubilização de Fosfato de Cálcio

O fósforo é um dos elementos essenciais para as culturas, participando de diversos processos biológicos, entretanto, em solos tropicais este elemento encontra-se pouco disponível (SOUCHIE et al., 2005), e sua deficiência em solos ácidos é uma das limitações existentes na produção agrícola, pois o fósforo nestes tipos de solo encontra-se indisponível para as plantas devido ao fósforo solúvel em água se transformar em fosfato de ferro e fosfato de alumínio (NAKAYAMA et al., 1998).

Os microrganismos do solo solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos (SOUCHIE et al., 2005), facilitando sua disponibilidade às plantas,

atuando como alternativa para obtenção do mesmo, principalmente em ambientes que apresentam limitações deste mineral.

Em 1976, Ralston e McBride citado por Nahas et al. (1994), comprovou a atividade de microrganismos solubilizadores de fosfato, por meio da inoculação microbiana, em solo deficiente de fósforo ao qual foi adicionado fosfato de cálcio ou fosfato solúvel, obtendo-se um crescimento igual ou superior com o mineral insolúvel em plantas de *Pinus*.

Os microrganismos solubilizam fosfato por diversos mecanismos, dentre eles através da síntese de ácidos orgânicos (SILVA FILHO et al., 2002), sendo este o principal mecanismo de solubilização de fosfato mineral (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). Com esta síntese, o pH do solo é reduzido, sendo posteriormente o fósforo orgânico é mineralizado por meio de fosfatases ácidas (KHAN et al., 2009).

Entre os ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos, destacam-se os ácidos glicólicos, lácticos, oxálico, cítrico, málico, tartárico, succínico, entre outros (KUCEY et al., 1989).

Segundo estudos realizados por Silva Filho e colaboradores (2002), os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm maior capacidade e potencial para a solubilização de fosfatos naturais. Entre os gêneros bacterianos existentes, destacam-se *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* por serem mais eficientes solubilizadores de fosfato (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

A utilização de microrganismos que possuem a capacidade de realizar este tipo de solubilização tem sido empregada como forma de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, pois dessa forma haverá melhor aproveitamento dos fosfatos naturais (SILVA FILHO et al., 2002) e também dos fosfatos que se encontram adsorvidos.

3 ARTIGO: MECANISMOS DE CONTROLE DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM TOMATEIRO MEDIADOS POR RIZOBACTÉRIAS

3.1 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo elucidar quais mecanismos de antagonismo são responsáveis pelo biocontrole da murcha-de-esclerócio, que fatores estão envolvidos na promoção de crescimento em tomateiro por meio de rizobactérias e identificar e caracterizar esses isolados. Os testes foram realizados através de indicadores bioquímicos e bioensaios, em que foram verificados: a capacidade de produção de enzimas líticas; produção de compostos voláteis inibidores do crescimento do patógeno; capacidade de colonização de raízes; produção de sideróforos; efeitos dos sideróforos no crescimento fúngico; metabolismo de fontes de carbono; produção de auxinas; fixação assimbiótica de N₂; solubilização de fosfato de cálcio; antibiose por difusão em meio de cultura; promoção de crescimento em condições de casa-de-vegetação; influência das rizobactérias no crescimento de plântulas de tomateiro na ausência total de nutrientes; bem como a identificação das espécies. Os resultados demonstram que a competição por ferro e antibiose são mecanismos que explicam a capacidade de biocontrole da murcha-de-esclerócio exercido por rizobactérias, assim como a produção de auxinas e a fixação biológica de nitrogênio na promoção do crescimento. Também são demonstradas limitações do controle biológico, pela capacidade de competição depender do isolado de *Sclerotium rolfsii* e, da antibiose, da composição nutricional do meio de crescimento.

Palavras-chave: *Sclerotium rolfsii*, antibiose, sideróforos, controle biológico, *Solanum lycopersicum*, auxinas, fixação biológica de nitrogênio.

3.2 ABSTRACT

This research was aiming to elucidate the antagonism mechanisms responsible for the biocontrol of southern blight and the elements involved in growth promotion in tomato by rhizobacteria, and identify and characterize this isolates. Tests were performed by biochemical indicators and bioassays to verify: the production of lytic enzymes; production of inhibiting volatile compounds; root colonization capability; siderophores production; effect of siderophores in fungi growth; metabolism of carbon sources; auxins synthesis; N₂ assymbiotic fixation; calcium phosphate solubilization; antibiosis by diffusion in growth media; growth promotion in greenhouse conditions; influence of rhizobacteria in tomato growth in conditions of exogenous nutrients absence; as well the identification of the rhizobacteria using rDNA 16S sequencing and fatty acid profile. The results indicate that iron competition and antibiosis are mechanisms that explain the biocontrol capability of southern blight by rhizobacteria just as auxin production and biological nitrogen

fixation in growth promotion. Limitations in biological control are demonstrated because the competition capability is specific for *Sclerotium rolfsii* strain as well as antibiosis for nutritional composition of growth media.

Keywords: *Sclerotium rolfsii*, antibiosis, siderophores, biological control, *Solanum lycopersicum*, auxins, biological nitrogen fixation.

3.3 INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente rico, onde as bactérias compõem a maior população de microrganismos que, por sua vez, influenciam na fertilidade do solo (STAMFORD et al., 2005), propiciando diversas transformações químicas, físicas e biológicas, de fundamental importância na agricultura (SOTTERO, 2003).

Neste universo, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) são conhecidas por estimularem desenvolvimento vegetal, além de serem eficientes competidoras com organismos deletérios na região da rizosfera. Como consequência, são empregadas no controle de fitopatógenos, no aproveitamento mais eficaz de fertilizantes e como rizoremediadoras, pela degradação de compostos nocivos às plantas (BAKKER et al., 2007).

Dentre os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal por bactérias, frequentemente estão envolvidos a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI e BALDANI, 2005), secreção de ácido indol acético (SILVEIRA, 2008) e a capacidade de solubilização de fosfatos (SOUCHIE et al., 2005).

Já os mecanismos de antagonismo relacionados ao controle biológico de fitopatógenos, normalmente envolvem a produção de enzimas líticas como quitinases (KAVINO et al., 2010) e a produção de antibióticos difusíveis (AHMAD et al., 2008), enquanto o sequestro de ferro por sideróforos está associado tanto à promoção do crescimento quanto ao controle biológico (GLICK, 1999; AHMAD et al., 2008).

Entretanto, muitas vezes a produção destes compostos e os bioensaios são utilizados como meio para seleção de rizobactérias (AHMAD et al., 2008) e os resultados promissores observados *in vitro* não são verificados *in vivo*.

Nesse contexto, a investigação dos mecanismos de controle deve constituir uma etapa posterior ao processo de seleção, em que se determina quais deles explicam e têm importância ao interferir no processo de infecção por um fitopatógeno, a não ser para casos em que estes mecanismos já estejam bem estabelecidos.

Outros dois aspectos a serem levados em consideração é a especificidade dos mecanismos envolvidos a determinadas populações do patógeno e a perda da capacidade de síntese ou da atividade de metabólitos em função das condições do

ambiente, o que pode levar ao insucesso do antagonista em exercer o biocontrole, aspectos esses que, normalmente, não são considerados.

A partir de um processo de seleção *in vivo* de rizobactérias visando o controle da murcha-de-esclerócio em tomateiro, BARBOSA (2009) obteve quatro rizobactérias que apresentaram potencial de serem empregadas como agentes de controle biológico, sem efeito deletério ao crescimento das plantas. Considerando que o sítio e o modo de infecção de *Sclerotium rolfsii*, um fungo habitante do solo e agente causal da murcha-de-esclerócio, é formulada a hipótese de que os mecanismos diretos de antagonismo são responsáveis pela capacidade de controle exercida por estas rizobactérias.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivos: elucidar quais destes mecanismos são responsáveis pelo biocontrole da murcha-de-esclerócio, que fatores estão envolvidos na promoção de crescimento em tomateiro, identificar e caracterizar as rizobactérias selecionadas *in vivo* para o controle da doença neste hospedeiro.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa-de-vegetação da Embrapa Roraima, com exceção dos testes de identificação das rizobactérias por meio da amplificação por PCR e sequenciamento da região rDNA 16S, realizado na Embrapa Agrobiologia, e do perfil de ácidos graxos realizado na Embrapa Meio Ambiente.

3.4.1 Origem dos isolados

As rizobactérias utilizadas, 31223, 32238, 33282 e 38291, foram isoladas da rizosfera de tomateiros saudáveis, coletados em diferentes municípios no estado de Roraima, com características distintas, e selecionadas dentre 274 isolados, para o controle de *S. rolf sii* na cultura do tomate, em que os mesmos foram capazes de reduzir a severidade da doença (BARBOSA, 2009).

O isolado 258 de *S. rolf sii*, foi obtido do pimentão (*Capsicum annuum* L.), mantido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Roraima e utilizado durante o processo de seleção dos antagonistas em condições de casa-de-vegetação. Além deste, foram utilizados os isolados 561 proveniente da cultura da melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai) e 517-1 obtido da cultura da mamona (*Ricinus communis* L.). Para verificação da divergência genética entre os isolados de *S. rolf sii* foi realizado pareamento em meio de cultura BDA (batata dextrose agar), em que se verificou a presença ou não de uma zona de aversão na região de encontro entre duas colônias. A zona de aversão indica que os mesmos não são clonais (OKABE e MATSUMOTO, 2000; CILLIERS et al., 2000).

3.4.2 Identificação das rizobactérias

3.4.2.1 Teste de Gram

Em uma lâmina de microscopia foram adicionadas 2 gotas de KOH 3% e depositadas com uma alça de repicagem, células bacterianas de cada rizobactéria, homogeneizando a suspensão por aproximadamente 30 s. Foi considerado que a observação de uma consistência mucoide define que a bactéria é Gram-negativa e, quando aquosa, Gram-positiva (SCHAAD et al., 2001).

3.4.2.2 Perfil de ácidos graxos

As colônias foram repicadas para placas de Petri contendo o meio agar triptona de soja (TSBA, Difco[™], Sparks, MD, USA) e mantidas por 24 h em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. A metodologia para caracterização dos perfis de ácidos graxos seguiu as instruções do MIS Operating Manual (2001) que acompanha o aparelho de cromatografia gasosa da Agilent 6850 com injetor automático e o cromatograma analisado por meio do Microbial Identification System software (Sherlock TSBA40 library; MIDI Inc., Newark, DE, USA) (DIAS et al., 2009).

3.4.2.3 Amplificação por PCR e sequenciamento da região rDNA 16S

O sequenciamento da região rDNA 16S foi realizado de acordo com Videira et al. (2009), em que as células bacterianas foram crescidas em meio líquido até a fase logarítmica, em seguida 2,0 mL foi coletado e centrifugado por 5 min 5.000 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi imerso em N₂ líquido,

ressuspendido em 570 μL de T10E1+30 μL SDS 10% e incubado por 1 h sob breve agitação. Em seguida, adicionou-se 100 μL de NaCl e as amostras homogeneizadas em vortex por 15 s. Foram adicionados 100 μL de CTAB/NaCl 10% seguindo-se homogeneização em vórtex por 15 s e incubação das amostras sob agitação por cerca de 1 h. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo, sendo adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e incubado por 10 min sob agitação. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 15 min, o sobrenadante coletado e adicionado 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool Isoamílico (24:24:1) homogeneizando-se por inversão por 10 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 min, a fase aquosa coletada em um novo tubo e adicionados 1/10 volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 2 volumes de etanol 100%. As amostras precipitadas após 2 h a -20°C foram submetidas a centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante descartado. A esta etapa seguiu-se uma etapa de lavagem com 1 mL de EtOH 70% misturando-se gentilmente por inversão. Foi realizada uma etapa de centrifugação a 9.600 rpm por 5 min a 4°C e o sobrenadante descartado, sendo esta etapa de lavagem com etanol realizada duas vezes. Finalmente, o precipitado foi ressuspendido em 50 μL de T10E1 e estocado em freezer a -20°C. Posteriormente, foram realizadas duas reações de PCR para cada uma das amostras da extração de DNA pelo método CTAB: 1 (33282), 2 (38291), 4 (31223a) e 5 (32238). O material foi diluído 10X em H₂O PCR e a reação realizou-se utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) Amp2 e 27f nas seguintes condições: 1 μL de DNA (1:10), 6 μL MgCl₂ (25 mM), 0,5 μL Amp2 (5 μM), 0,5 μL 27f (5 μM), 1,5 dNTP (10 mM), 0,25 Taq DNA polimerase 5U/ μL (Fermentas life Sciences), 2,5 μL DMSO 50%, 5,0 tampão KCl 10X (Fermentas life Sciences), 32,75 μL H₂O PCR para um volume final de reação 50,00 μL .

Em seguida utilizou-se o seguinte programa em termociclador: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, e finalmente uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C, e mantidos até 4°C. Após o término da reação 3,0 μL da reação de PCR do produto da reação foram utilizados para uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da eficiência de amplificação. O

produto de PCR foi purificado utilizando o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit^R* (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático de DNA MegaBACE1000 com o kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare Cat N° US81090) e os primers para o gene 16S rDNA, 27F, AMP2, U6, U3, U2, RU2, RU3, RU6, RU7 e 786F. Foram utilizados 200 ng do produto de PCR após purificação utilizando o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit^R* (GE Healthcare). A sequência do 16S de cada bactéria foi montada utilizando os resultados das reações de sequenciamento e o programa PhredPhrap. Após a montagem foram elaboradas análises de similaridade utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e o banco de sequências não redundantes do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O dendrograma filogenético foi elaborado por meio do software MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007), pelo método de agrupamento da distância média UPGMA (GRONAU e MORAN, 2007), utilizando para as comparações, espécies tipo depositadas em coleções de culturas, dos gêneros que apresentaram maior similaridade com as rizobactérias.

3.4.3 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono

A capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono foi avaliada pelo uso do kit Biolog[®] GN2 para bactérias Gram-negativas, constituído por uma microplaca, contendo 96 cavidades, com 95 fontes distintas de carbono, em que o cloreto de trifênil tetrazólio promove a mudança de coloração se houver crescimento bacteriano na cavidade. Foram preparadas suspensões das rizobactérias em solução salina estéril (0,85% de NaCl), após 48 h de crescimento em meio 523 (KADO e HESKETT, 1970), ajustando-se a concentração à $Abs_{540} = 0,120$, seguindo as recomendações do fabricante. Após este procedimento foram adicionados 150 μ L da suspensão bacteriana em cada cavidade, com auxílio de um pipetador multicanal, sendo cada placa utilizada para uma única rizobactéria. Em seguida, as placas foram mantidas a 25 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 h durante 3 dias,

sendo posteriormente avaliados o crescimento bacteriano por meio de leitora de microplacas ELISA, no comprimento de onda de 492 nm. Como controle negativo foi determinada a absorvância registrada na cavidade com ausência de fontes de carbono.

3.4.4 Capacidade de fixação de N₂

A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Estrada de Los Santos et al. (2001). Após 48 h de crescimento em meio DYGS, cada rizobactéria foi repicada para frascos de vidro com capacidade de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido BMGM, isento de fontes de nitrogênio. Foram utilizadas 2 repetições para cada tratamento, com e sem adição de extrato de levedura. As amostras foram mantidas por 10 dias a 28 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 h. A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico foi evidenciada pela presença de formação de película na superfície do meio de cultura (DÖBEREINER et al., 1995).

3.4.5 Capacidade de produção de ácido indol acético (AIA)

Foi utilizada a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). Os isolados foram cultivados em 5 mL de meio de cultura DYGS líquido com 100 µg mL de triptofano por 48 h a 30 °C, sob agitação constante em agitador orbital a 150 rpm. Após esse período, uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min a 520 g, e 150 µl do material em suspensão foi aplicado em cavidades de uma microplaca de poliestireno, sendo 4 repetições para cada rizobactéria. Sobre as amostras, foi adicionado 100 µl do reagente de Salkowisk (1 mL de FeCl₃.6 H₂O 0,5 M em 50 mL de HClO₄ a 35%), e as placas permaneceram no escuro por 30 min. A produção do hormônio foi constatada em leitora de placas ELISA, em comprimento de onda de 492 nm.

3.4.6 Capacidade de Solubilização de Fosfato de Cálcio

A capacidade de solubilização de fosfato foi verificada em meio de cultura GL sólido (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Depois de esterilizado, e com temperatura próxima a 50 °C, foram adicionados ao meio, 50 mL de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de $CaCl_2$ (10%), para formação de precipitado insolúvel de $CaHPO_4$, sendo em seguida distribuído em placas de Petri. Cada isolado, foi semeado em um ponto do meio de cultura e as placas foram mantidas por 10 dias a 30 °C em BOD no escuro. Após este período, foi realizada a avaliação visual para verificação da formação de halo transparente de solubilização no meio de cultura originalmente opaco, característica que indica a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio.

3.4.7 Produção de quitinase

Para detecção da produção de quitinase, foi utilizado o meio mineral Renwick et al. (1991), em que a quitina coloidal 0,08% é a única fonte de carbono. Posteriormente, as rizobactérias foram semeadas em distintos locais da superfície do meio e as placas mantidas a 25 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 h durante 10 dias. Cada rizobactéria foi repicada por 3 vezes. Após esse período, foi avaliada a produção de quitinase pela observação de um halo transparente ao redor da colônia contrastando com o restante do meio com aspecto leitoso.

3.4.8 Produção de β -1,3-glucanase

Para detecção da produção de β -1,3-glucanase, foi utilizado o meio mineral Renwick et al. (1991), em que a laminarina a 0,5% foi a única fonte de carbono. Os isolados foram semeados em distintos locais da superfície do meio de cultura e as placas mantidas a 25 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 h durante 10 dias. Cada tratamento foi composto por uma rizobactéria com 3 repetições. Após esse período,

a superfície do meio de cultura foi coberta com uma solução de vermelho do Congo 0,5% por 90 min, sendo o excesso eliminado. A constatação da capacidade de produção de β -1,3-glucanase foi evidenciada pela observação visual um halo laranja claro ao redor da colônia, contrastando com o restante do meio com aspecto vermelho-alaranjado.

3.4.9 Antibiose por compostos voláteis

Foram utilizadas placas de Petri com 85 mm de diâmetro, divididas em três compartimentos (FERNANDO et al., 2005). O primeiro compartimento de todas as placas foi preenchido com meio 523 (KADO e HESKETT, 1970) e semeadas as rizobactérias, no segundo compartimento foi adicionado o meio BDA (batata dextrose agar), onde se depositou um disco de micélio de *S. rolfsii* com 5 mm de diâmetro, no terceiro compartimento foi constituído pela presença ou ausência de 5 g de carvão ativado. Adicionalmente ao tratamento com carvão ativado, foi utilizada como testemunha, placas de Petri tripartidas contendo somente o disco de micélio de *S. rolfsii* em BDA, em um dos compartimentos, sendo os demais mantidos vazios. As placas foram fechadas com parafilm e mantidas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. A taxa de crescimento fúngico foi calculada a cada 24 h por 4 dias consecutivos, pela medição ortogonal do diâmetro da colônia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 (rizobactérias) x 2 (com e sem carvão ativado) x 2 (testemunhas), constituído por 6 repetições para cada tratamento, que foi composto por uma rizobactéria diferente, com 2 testemunhas. A análise estatística foi feita por contraste de médias em relação às testemunhas, por meio do software SAS versão 9 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

3.4.10 Antibiose por difusão em meio de cultura

As rizobactérias foram cultivadas por 48 h em meio 523 (KADO e HESKETT,

1970) e preparada uma suspensão em água destilada esterilizada, ajustada à $Abs_{540} = 0,2$. Posteriormente, foram semeados, por espalhamento com uma alça de Drigalski, 100 μ L da suspensão em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio 523 (KADO e HESKETT, 1970). Após 4 dias, as células bacterianas foram mortas por meio de vapor de clorofórmio por um período de 2 h, mantendo-se as placas abertas por 4 h para sua volatização. Uma sobrecamada de Batata-Dextrose-Agar (BDA) foi vertida, semeando-se no centro da placa um disco de micélio de *S. rolfsii*, obtido de uma colônia com 96 h de crescimento. As medições ortogonais dos diâmetros das colônias foram realizadas diariamente por um período de 5 dias consecutivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 6 repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. A partir das médias foi obtida a taxa de crescimento micelial e os dados analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 (SAS Institute Inc., Cary, USA) e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4.11 Produção de sideróforos

Foi utilizada a metodologia descrita por Schwyn e Neilands (1987), adaptada por Macagnan et al.(2008), em que as rizobactérias foram cultivadas, por 48 horas sob contínua agitação, em meio líquido B de King (KING et al., 1954). Como controle negativo foram cultivadas as rizobactérias no mesmo meio acrescido de 2 μ M de Fe^{2+} .mL⁻¹ preparado a partir de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e esterilizado por autoclavagem. Posteriormente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min e adicionado 1 mL do sobrenadante à 1 mL da solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS). Para constatação da produção de sideróforos pelas rizobactérias foi observada a mudança de coloração da mistura de azul para amarelo-alaranjado, em um período de até 15 min.

3.4.12 Efeito dos sideróforos no crescimento de *S. rolfsii*

Inicialmente as rizobactérias foram cultivadas por 48 h e posteriormente preparada uma suspensão em água destilada esterilizada ajustada à $Abs_{540} = 0,2$. Em seguida, foram semeados, por espalhamento com uma alça de Drigalski, 100 μL da suspensão em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio B de King (KING et al., 1954), com e sem a adição de $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$ preparado a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. As placas foram mantidas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em BOD, com fotoperíodo de 12 h durante 4 dias. Após esse período as células bacterianas foram mortas por meio de vapor de clorofórmio por um período de 2 h. Após 4 h, foi vertida uma segunda camada do meio B de King (KING et al., 1954), com e sem a presença de $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$, e semeado um disco de micélio de *S. rolfsii* no centro de cada placa. As taxas de crescimento fúngico foram obtidas por meio das medições ortogonais do diâmetro da colônia realizadas por um período de 6 dias consecutivos. Cada tratamento, com exceção das testemunhas, foi composto por um isolado de rizobactéria, contendo 6 repetições cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 6 repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. A partir das médias foi obtida a taxa de crescimento micelial e os dados obtidos foram analisados por meio de arranjo fatorial $5 (4 \text{ isolados} + \text{testemunha}) \times 2$ (com e sem a presença de ferro), através do proc GLM do software SAS versão 9 (SAS Institute Inc., Cary, USA) e comparadas pelo teste Fisher-LSD a 5% de probabilidade.

3.4.13 Capacidade de colonização de raízes de tomateiro e influência no crescimento de plântulas de tomateiro na ausência total de nutrientes

As rizobactérias foram cultivadas por 48 h em tubos de ensaio contendo meio 523 (KADO e HESKETT, 1970). Para obtenção da suspensão bacteriana foram adicionados aos tubos solução salina estéril (0,85% de NaCl), seguido por agitação e a concentração ajustada em espectrofotômetro a $Abs_{540} = 0,5$. As sementes de

tomate cv. Santa Clara foram previamente desinfestadas em álcool a 50% por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio a 2% por 3 min, sendo lavadas por três vezes em água estéril. Em seguida, as sementes foram embebidas em 5 mL da suspensão bacteriana por 24 h e depois transferidas para tubos contendo agar-água a 0,6% (SILVA et al., 2003). Como testemunha as sementes foram embebidas em água destilada estéril. Os tubos foram mantidos a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 10 repetições, sendo para cada repetição um tubo de ensaio. Após 12 dias foram avaliados o comprimento da radícula e da parte aérea e a capacidade de colonização de raízes pela rizobactéria verificada pela observação do crescimento leitoso na rizosfera (SILVA et al., 2003). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente usando o proc GLM do software SAS versão 9 (SAS Institute Inc., Cary, USA) e comparadas pelo teste de Fisher-LSD a 5% de probabilidade.

3.4.14 Capacidade de promoção de crescimento em condições de casa-de-vegetação

As sementes de tomate cv. Santa Clara foram previamente desinfestadas em álcool a 50% por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio a 2% por 3 min, sendo lavadas por 3 vezes em água estéril. Em seguida, as sementes foram embebidas em 5 mL da suspensão bacteriana de cada isolado e mantidas em temperatura ambiente por 24 h. Como testemunha as sementes foram embebidas em água destilada estéril. Posteriormente foram plantadas em sementeiras, contendo substrato Plantmax[®] e, após 30 dias, transplantadas para vasos contendo solo esterilizado. Após 28 dias do transplântio foi mensurada a altura das plantas e, em seguida, as plantas foram removidas dos vasos para lavagem das raízes, secas em estufa de circulação de ar forçado a 60°C por 5 dias e pesadas (parte aérea e raiz). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, contendo 10 repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o proc GLM do software SAS versão 9 (SAS Institute Inc., Cary, USA) e as médias comparadas pelo teste de Fisher-LSD a 5% de probabilidade.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada zona de aversão na região de encontro para os isolados de *S. rolfsii* 258, 517-1 e 561 quando pareados entre si, indicando que os três isolados utilizados nos bioensaios não pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade micelial e, portanto, não são clonais. Esta característica permite uma comparação não tendenciosa dos resultados envolvendo os ensaios do efeito dos sideróforos e de antibiose para os diferentes isolados do patógeno.

Identificação e caracterização das rizobactérias

Todas as rizobactérias foram Gram-negativas e de acordo com a base de dados disponível existente no método de identificação utilizando o perfil de ácidos graxos, os isolados 31223 e 33282 apresentaram, respectivamente, 77 e 87% de similaridade com o perfil de *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*). Entretanto, para as rizobactérias 32238 e 38291, os níveis de similaridade encontrados pela análise do perfil de ácidos graxos foram baixos e divergentes dos obtidos pelo sequenciamento da região 16S rDNA, método este que permitiu posicionar taxonomicamente com maior confiabilidade as rizobactérias, quando comparadas com espécies tipo dos gêneros que apresentaram maior similaridade de sequências da região 16S rDNA (Figura 3.5.1).

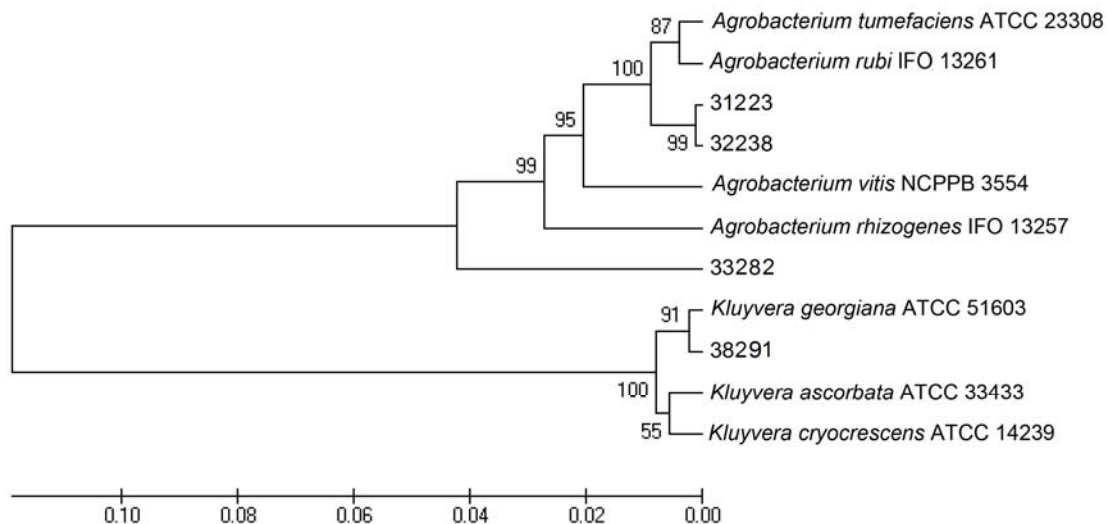


Figura 3.5.1 – Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, comparadas com bactérias presentes no banco de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas no programa BLAST e agrupadas pelo método UPGMA no programa MEGA 4.1.

Com estes resultados, se verifica que as rizobactérias 31223 e 32238, selecionadas como agentes de biocontrole, estão posicionadas dentro do gênero *Agrobacterium*. Embora a rizobactéria 33282 esteja próxima ao gênero *Agrobacterium* apresentando características semelhantes, é possível que este isolado pertença a um gênero diferente, sendo necessário um estudo mais aprofundado para averiguação; enquanto a rizobactéria 38291 apresenta alta similaridade com *Kluyvera georgiana*.

Embora a espécie *Agrobacterium tumefaciens* seja reportada como responsável pela formação de galhas em tomateiro, os experimentos realizados com os isolados 31223 e 32238, identificados pelo perfil de ácidos graxos como *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*), não apresentaram sintomas desta doença. A análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA destas rizobactérias, quando comparadas com bactérias presentes no banco de dados do NCBI, evidenciaram que as mesmas não se encontram agrupadas com a espécie patogênica *Agrobacterium tumefaciens*.

Entretanto, o gênero *Agrobacterium*, um membro da família *Rhizobiaceae*,

apresenta contradição em sua taxonomia, devido à proposição da sua reclassificação no gênero *Rhizobium* (FARRAND et al., 2003; YOUNG, 2003).

Utilização de fontes de carbono

Para o metabolismo de fontes de carbono, foi observado que todos os isolados testados foram capazes de metabolizar mais de 50% dos diferentes compostos, destacando-se os isolados 33282 e 38291 que metabolizaram 77,08% e 73,95% das fontes, respectivamente.

Todos os isolados usaram as fontes de carbono tween 40, tween 80, adonitol, gentiobiose, α -D-lactose, lactulose, D-rafinose, D-sorbitol, ácido α - hidroxibutírico, ácido glicil-L- glutâmico, D-glicose-6-fosfato, L-arabinose, i-eritritol, D-frutose, L-fucose, D-galactose, α -D-glucose, maltose, D-manitol, D-trealose, ácido mono-metil-ester-succínico, ácido cis- aconítico, ácido D- galacturônico, ácido ρ -hidroxifenilacético, ácido itacônico, ácido α -ceto valérico, ácido succinâmico, L-alaninamida, L-asparagina, ácido L- glutâmico, L-histidina, L-hidroxi prolina, L-leucina, L-prolina, L-treonina, ácido urocânico, inosina e glicerol. Entretanto, nenhum deles metabolizou α -ciclodextrina, glicogênio, ácido acético, ácido fórmico, ácido malônico, D,L-carnitina, timidina, putrescina, 2-aminoetanol, 2,3-butanodiol e D,L- α -glicerofosfato; para as demais fontes houve variação na sua utilização conforme apresentado no Tabela 3.5.2.

Tabela 3.5.2 - Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono pelos isolados de rizobactérias selecionadas para o controle da murcha-de-esclerócio, por meio do kit Biolog® GN2.

Fontes de carbono	Rizobactéria			
	31223	32238	33282	38291
Dextrina	-	-	+	+
N-acetil-D-galactosamina	-	-	+	+
N-acetil-D-glucosamina	-	+	+	+
D-arabitol	+	-	+	+
D-celobiose	-	+	+	-
m-inositol	+	-	+	+
D-manose	+	+	+	-
D-melibiose	+	-	+	-
β-metil-D-glucosídeo	+	+	+	-
D-psicose	-	+	+	+
L-ramose	+	-	+	+
Sacarose	+	-	+	+
Turanose	+	-	+	+
Xilitol	+	-	+	+
Ácido metil-ester- pirúvico	-	+	+	+
Ácido cítrico	+	+	+	-
Ácido D-galactônico lactona	-	+	+	+
Ácido D-glucônico	-	+	+	+
Ácido D- glucosamínico	-	+	+	+
Ácido D- glucurônico	-	+	+	+
Ácido β- hidroxibutírico	-	+	+	+
Ácido γ- hidroxibutírico	+	-	+	-
Ácido succínico	+	+	+	-
Ácido bromosuccínico	-	+	-	-
Glucuronamida	-	+	-	-
D-alanina	-	+	+	+
L-alanil-glicina	-	+	+	+
Ácido L- aspártico	-	+	+	+

continua...

Fontes de carbono	Rizobactéria			
	31223	32238	33282	38291
Ácido glicil-L- aspártico	-	+	+	+
L-ornitina	-	+	+	+
L-fenilalanina	+	+	-	+
Ácido L- piroglutâmico	-	+	+	+
D-serina	-	-	-	+
Ácido γ - amino butírico	+	-	+	+
Uridina	-	+	+	+
Feniletilamina	+	+	-	+
α -D-glicose-1-fosfato	+	-	+	+
α -keto ácido glutárico	-	+	-	+
Ácido D, L-lático	-	+	+	+
Ácido propiônico	-	-	+	-
Ácido quínico	-	-	+	+
Ácido D- sacárico	+	+	-	+
Ácido sebácico	-	-	-	+

A habilidade das rizobactérias em utilizar muitas fontes de carbono é um fator importante no processo de seleção de rizobactérias já que bactérias mais versáteis podem lhe dar uma vantagem de competição por nicho. A utilização de múltiplas fontes de carbono presentes nos exsudatos radiculares pode favorecer o seu estabelecimento na rizosfera, configurando uma vantagem competitiva sobre outras bactérias nativas do solo (COELHO, 2006) além de poder reduzir o potencial de inóculo do patógeno. Entretanto, para que se possa avaliar a capacidade de competição por nutrientes entre rizobactéria e patógeno, é necessário que se saiba quais nutrientes são utilizados por ambos os organismos, a fim de se definir se há sobreposição na utilização de fontes em comum.

Fixação assimbiótica de N₂

Com relação à fixação biológica de nitrogênio (FBN), os isolados 31223, 32238, 33282 demonstraram capacidade de fixar nitrogênio, apresentando formação de película baixa no meio BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) (Apêndice A).

A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelo microrganismo para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão (BRASIL, 2005); permitindo uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência, proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase, que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio.

Especificamente em tomateiro, a fixação de nitrogênio mediada por bactérias é pouco reportada. Esta característica foi observada por Mohandas (1988), que constatou este evento tanto no filoplano como no rizoplano. Além do rizoplano, Caballero-Mellado et al. (2007), estudando bactérias do gênero *Burkholderia*, também isolaram estas bactérias da rizosfera de plantas de tomateiro e constataram a presença do gene *NifH* nestes isolados, sugerindo que estas bactérias poderiam estar contribuindo para fixação de nitrogênio.

Produção de ácido indol acético

A produção de ácido indol acético (AIA) foi detectada para os isolados 31223 e 33282 (Apêndice B). A síntese e secreção de auxinas por espécies pertencentes ao gênero *Agrobacterium* isoladas de raízes de orquídeas foi relatada por Tsavkelova et al. (2007) sendo capazes de produzir altas concentrações de AIA em meio de cultura.

O AIA pertence ao grupo das auxinas, tendo como precursor de sua biossíntese o triptofano, que se encontra presente nos tecidos vegetais na forma livre ou incorporada (BAUTISTA e GALLARDO, 2008).

Este fitormônio promove o crescimento vegetal por estimular o crescimento da planta hospedeira e o desenvolvimento do sistema radicular da mesma, atuando no aumento da alongação, divisão e diferenciação celular (DOBBELAERE et al., 2003), estimulando também a atividade da nitrogenase (TIEN et al., 1979).

Solubilização de fosfato de cálcio

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi observada para os isolados 33282 e 38291 (Apêndice C).

Esta habilidade tem sido atribuída à capacidade de alteração do pH do meio, por meio da liberação de ácidos orgânicos como citrato, lactato, succinato, dentre outros (HARIPRASAD e NIRANJANA, 2009), enquanto que para mineralização de fósforo orgânico, as fosfatases ácidas são de grande importância (SOUCHIE, 2004). Um fato a ser verificado é a capacidade destas bactérias em facilitar a absorção de cálcio pela planta, uma vez que a solubilização de fosfato de cálcio pode ter contribuído para maior disponibilidade deste elemento, aumentando a resistência à doença. Ao cálcio é atribuída a propriedade de reduzir a atividade de enzimas pectolíticas produzidas por *S. rolfisii* (DEACON, 1997), o que é corroborado por dados experimentais que demonstram que a maior disponibilidade deste elemento no solo está relacionada com a redução na incidência da doença (LIU et al., 2007).

Das quatro rizobactérias avaliadas, os isolados 31223 e 33282 se destacaram por apresentar resultados positivos para duas características relacionadas com a promoção de crescimento, respectivamente (Tabela 3.5.3). A primeira apresentou capacidade de fixar nitrogênio e produzir AIA, enquanto a segunda, apresentou além dessas, a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio.

Tabela 3.5.3 - Capacidade das rizobactérias quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio (SFC).

Rizobactéria	FBN	AIA	SFC
31223	+	+	-
32238	+	-	-
33282	+	+	+
38291	-	-	+

Capacidade de promoção de crescimento vegetal

A capacidade de promoção de crescimento em condições de casa-de-vegetação, por meio da veiculação das bactérias pelas sementes foi verificada para as rizobactérias 31223 e 32238, que se destacaram para todas as variáveis testadas (altura das plantas, peso de raiz, peso de parte aérea e peso total da planta), promovendo maior crescimento em plantas de tomateiro, enquanto o isolado 33282 apresentou um resultado intermediário (Tabela 3.5.4). O isolado 38291, apesar de pertencer ao gênero *Kluyvera*, ao qual BURD et al. (2000) atribuiu a capacidade de promoção de crescimento por um mutante capaz de produzir sideróforo, não apresentou efeito significativo para este atributo, por outro lado, também não foi observado efeito deletério ao crescimento das plantas.

Tabela 3.5.4 – Efeito de rizobactérias na altura (cm), massa seca raiz (g), massa seca parte aérea (g) e massa seca total de tomateiros em diferentes parâmetros indicadores de promoção de crescimento, em condições de casa-de-vegetação.

Rizobactéria	Altura (cm)	Massa seca raiz (g)	Massa seca parte aérea (g)	Massa seca total da planta (g)
31223	36,60 a	0,83 ab	1,57 a	1,79 a
32238	35,30 a	0,89 a	1,46 ab	1,72 ab
33282	31,40 ab	0,74 abc	1,33 abc	1,52 abc
38291	32,60 ab	0,67 bc	1,19 bc	1,38 bc
Testemunha	28,50 b	0,62 c	1,14 c	1,30 c

Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%.

Todas as rizobactérias testadas foram capazes de colonizar raízes de tomateiros (Apêndice D), quando veiculadas por meio da microbiolização das sementes e supridas somente pelos exsudatos radiculares.

A colonização radicular além de ser considerada por alguns autores um importante critério de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (SILVA et al., 2003; MAFIA et al., 2009) constitui uma vantagem, pois permite que se estabeleça associação desde a emissão da radícula e que estas sejam viabilizadas por meio de sementes.

Tabela 3.5.5 - Efeito das rizobactérias selecionadas no crescimento da parte aérea e radicular de plântulas de tomateiro *in vitro*, em meio agar-água.

Rizobactéria	Comprimento do epicótilo (cm)	Comprimento da radícula (cm)
31223	4,54 bc	4,90 bc
32238	3,34 c	4,29 cd
33282	7,91 a	5,77 a
38291	5,80 b	3,93 d
Testemunha	8,60 a	5,59 ab

Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%.

Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio

A quitinase e a β -1,3 glucanase são duas enzimas frequentemente produzidas por antagonistas (MANJULA et al., 2004; ARORA et al., 2007) e têm como finalidade a degradação da parede celular do fungo, sendo um mecanismo relacionado ao bicontrol. Como resultado nenhuma das rizobactérias foi capaz de produzir quitinase ou β -1,3 glucanase; evidenciando que estas enzimas não estão relacionadas à capacidade de biocontrole.

Os resultados demonstraram não haver evidências da produção de compostos voláteis pelas rizobactérias, capazes de inibir o crescimento de *S. rolfsii*, já que não houve interação significativa entre as rizobactérias e a presença ou ausência de carvão ativado no terceiro compartimento, nem redução significativa da taxa de crescimento do patógeno nas placas tripartidas, em relação aos tratamentos controle.

A ausência de inibição do crescimento micelial por compostos voláteis pode ter ocorrido devido a não produção destes elementos pelas rizobactérias testadas ou pela capacidade de detoxificação dos compostos produzidos, como ocorre em fungos que convertem cianeto de hidrogênio (HCN) em formamida por meio da enzima cianeto hidratase (OSBOURN, 1996).

Já para compostos inibidores do crescimento de *S. rolfsii* difusíveis em meio

de cultura, os resultados obtidos demonstram que somente o isolado 38291 é capaz de produzi-lo (Apêndice E), havendo redução significativa da taxa de crescimento micelial para os três isolados de *S. rolfsii* testados (Tabela 3.5.6).

Tabela 3.5.6 – Taxa de crescimento micelial (cm) de três isolados de *Sclerotium rolfsii* por rizobactérias selecionadas, por meio da difusão de compostos em meio de cultura.

Rizobactéria	<i>S. rolfsii</i> 258 (cm)	<i>S. rolfsii</i> 517-1 (cm)	<i>S. rolfsii</i> 561 (cm)
31223	1,50 a	2,52 a	1,90 a
32238	1,51 a	2,47 a	1,67 a
33282	1,44 a	2,67 a	2,07 a
38291	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Testemunha	1,19 a	2,67 a	2,05 a

Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Esta habilidade comprova a observação realizada por Barbosa (2009), em que o antagonista 38291 restringiu o desenvolvimento do patógeno, conforme evidenciado pela visualização de um halo de inibição *in vitro*. Este antagonista, também foi o que apresentou, com maior repetitividade, redução da intensidade da doença em condições de casa-de-vegetação.

Tem sido verificado que a síntese de substâncias antimicrobianas é importante para alguns microrganismos que atuam no controle biológico, como bactérias da espécie *Pseudomonas fluorescens* (BOTELHO et al., 2006) e os gêneros *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Burkholderia* que são capazes de produzir fenazinas (SPAEPEN et al., 2009). Entretanto, a propriedade fungitóxica ou fungistática (JOHANSSON, 2003) de alguns compostos relatados como responsáveis pelo mecanismo de antibiose, é variável dependendo da concentração.

A produção de sideróforos foi constatada para todas as rizobactérias, com variação na afinidade por ferro. Foi observado que o isolado 31223 produziu sideróforo com maior capacidade de indisponibilizar íons ferro, evidenciado por uma coloração amarelo-alaranjada quando adicionado o CAS, seguido dos isolados 32238 e 33282 (Figura 3.5.7).

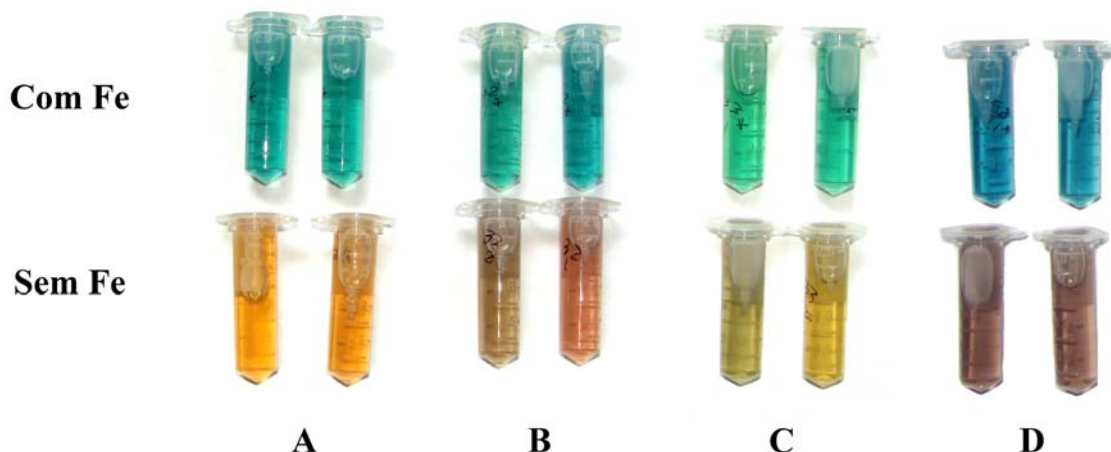


Figura 3.5.7 - Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos pelas rizobactérias 31223 (A), 32238 (B), 33282 (C) e 38291 (D), com 2 repetições, em que os microtubos localizados acima correspondem ao meio suplementado por $2 \mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$ e os localizados abaixo sem suplementação.

A capacidade do sideróforo em sequestrar íons ferro é evidenciada pela mudança de coloração do meio, que varia do azul ao amarelo-alaranjado, quando adicionado o reagente descrito por Schwinn e Neilands (1987) (Figura 3.5.7). Quanto mais alaranjado ficar o meio de cultura, maior capacidade tem o sideróforo em remover íons ferro do complexo de cromo azulol (SCHWINN e NEILANDS, 1987; AHMAD et al., 2008) e, conseqüentemente, maior é sua capacidade de indisponibilizar íons de ferro.

Esta propriedade também é evidenciada pela coloração esverdeada observada nos tratamentos em que o meio foi suplementado com sulfato ferroso, o que demonstra que, mesmo com esta suplementação, o sideróforo consegue quelar íons ferro.

Um fato que reforça a produção de sideróforos foi a interferência de algumas rizobactérias no crescimento de plântulas *in vitro*. Foi verificado que, quando

supridas somente pelos nutrientes que compõem os exsudatos radiculares, as rizobactérias 31223 e 32238 interferem negativamente no desenvolvimento das plântulas. Já para rizobactéria 38291 o metabólito responsável pelo mecanismo de antibiose, nestas condições, pode ter sido responsável pela redução do crescimento.

Entretanto, as rizobactérias 31223 e 32238 produtoras de sideróforos capazes de quelar ferro com maior eficiência, foram as que promoveram maior crescimento vegetal em condições de casa-de-vegetação (Tabela 3.5.4). Sabe-se que parte deste ferro pode ser disponibilizado para as plantas (GLICK, 1999) e que essas moléculas estimulam a produção de auxinas (DIMKPA et al., 2008), um hormônio produzido pelos isolados 31223 e 33282. Além disso, os sideróforos têm um papel indireto na promoção de crescimento, pois reduzem a toxicidade causada às plantas por metais pesados (BURD et al., 2000). Isso ocorre porque os sideróforos são capazes de quelar, além do ferro, elementos como Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} (DIMKPA et al., 2008).

A capacidade de rizobactérias pertencentes aos mesmos gêneros que as utilizadas neste trabalho em produzir sideróforos já foi reportada por outros autores. Como exemplos podem-se citar *Kluyvera ascorbata*, pertencente ao mesmo gênero que o antagonista 38291 (BURD et al., 2000) e espécies pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, relacionado aos antagonistas 31223, 32238 e 33282 (OGER et al., 2001; DAS et al., 2007).

Já os resultados do efeito da produção dos sideróforos no crescimento dos três isolados de *S. rolfsii* evidenciam que a rizobactéria 31223 teve maior capacidade de indisponibilizar íons ferro para o patógeno, pois houve supressão significativa da taxa de crescimento micelial dos três isolados de *S. rolfsii*, mesmo com suplementação por ferro, concordando com o resultado descrito anteriormente (Tabela 3.5.8). Por outro lado, a rizobactéria 32238 inibiu o crescimento dos isolados 258 (Apêndice F) e 561, mantendo sua atividade mesmo com o meio suplementado por ferro, enquanto a rizobactéria 33282, apresentou efeito inibitório sobre os isolados 561 e 517-1, porém a adição de ferro ao meio de cultura ocasionou a perda da capacidade de inibição.

Tabela 3.5.8 - Efeito da produção de sideróforos por rizobactérias na redução da taxa de crescimento micelial (cm) de três isolados de *Sclerotium rolfsii*, em meio B de King, com e sem suplementação por sulfato ferroso.

Rizobactéria	<i>Sclerotium rolfsii</i>					
	Isolado 258		Isolado 517-1		Isolado 561	
	(cm)		(cm)		(cm)	
	Sem Fe	Com Fe	Sem Fe	Com Fe	Sem Fe	Com Fe
31223	0,22 bA	0,00 cA	0,00 bB	0,73 bA	0,54 dB	1,11 cA
32238	0,00 bA	0,19 cA	0,72 aB	1,13 aA	1,01 bcA	1,18 bcA
33282	1,00 aA	0,71 bA	0,10 bB	1,13 aA	0,87 cB	1,32 abA
38291	0,13 bB	0,49 bA	0,68 aB	1,12 aA	1,13 abA	1,30 abcA
Testemunha	0,97 aA	1,15 aA	0,94 aB	1,11 aA	1,34 aA	1,38 aA

Médias seguidas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%, onde: letras maiúsculas representam comparações no sentido da linha e letras minúsculas representam comparações no sentido da coluna.

Para a rizobactéria 38291, foi verificada capacidade de inibição significativa para o crescimento do isolado 258. A contribuição de sideróforos, em adição ao mecanismo de antibiose, foi evidenciada por uma menor taxa de crescimento micelial do patógeno no meio de cultura sem suplementação de ferro, quando comparado ao tratamento em que houve suplementação por este elemento (Tabela 3.5.8).

Apesar de alguns autores considerarem que as pioverdinas são responsáveis pelo biocontrole de *S. rolfsii* exercido por bactérias do gênero *Pseudomonas* (GANESAN e GNANAMANICKAM, 1987; MANWAR et al., 2003), os resultados aqui encontrados indicam que o efeito do sideróforo produzido pelas rizobactérias na supressão do crescimento fúngico é dependente do isolado do patógeno desafiante. Isso ocorre devido a capacidade de produção destas moléculas também por fungos. Sideróforos do tipo hidroxamato, por exemplo, são produzidas por espécies do gênero *Trichoderma*, *Fusarium* e *Aspergillus* (RENSHAW et al., 2002; DAS et al., 2007). Portanto, a competição entre antagonista e patógeno e a eficiência de cada molécula em quelar íons ferro constituem fatores que podem estar diretamente relacionados com a capacidade de biocontrole. Também deve-se destacar que a

perda da capacidade de antibiose pela rizobactéria 38291 para os isolados 517-1 e 561 de *S. roffsii* em meio B de King (KING et al., 1954) indica que, dependendo da disponibilidade de nutrientes, o composto inibitório pode perder sua atividade, de acordo com o isolado do patógeno.

Portanto, os resultados indicam que a competição por ferro e antibiose por meio de compostos inibitórios difusíveis explicam a capacidade de biocontrole dos isolados selecionados e são mecanismos importantes no controle da murcha-de-esclerócio, assim como a produção de auxinas e fixação biológica de nitrogênio para a promoção do crescimento. Entretanto, o fato da capacidade de competição por ferro pelos sideróforos produzidos pelas rizobactérias ser dependente do isolado de *S. roffsii* e do efeito de antibiose ser perdido com a mudança da composição do meio de cultura, fornecem embasamento para explicar as causas do insucesso de antagonistas no controle de doenças em determinadas situações, já que muitos fatores influenciam na sua eficácia, devendo-se considerar as limitações do controle biológico por meio de antagonistas selecionados.

3.6 CONCLUSÕES

Todas as rizobactérias foram Gram-negativas, e quando comparadas com espécies tipo dos gêneros que apresentaram maior similaridade de sequências da região 16S rDNA, os isolados 31223 e 32238 foram posicionadas no gênero *Agrobacterium*.

Embora a rizobactéria 33282 esteja próxima ao gênero *Agrobacterium* apresentando características semelhantes, é possível que este isolado pertença a um gênero diferente, sendo necessário um estudo mais aprofundado para averiguação; enquanto a rizobactéria 38291 apresenta alta similaridade com *Kluyvera georgiana*.

Competição por ferro e antibiose são mecanismos importantes no controle da murcha-de-esclerócio pelas rizobactérias selecionadas;

A produção de auxinas, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato de cálcio pelas rizobactérias são mecanismos que atuam na promoção do crescimento em tomateiros;

A capacidade das rizobactérias competirem por ferro, ocasionando a inibição do crescimento fúngico, é dependente do isolado de *S. rolfsii*;

O efeito de antibiose pode ser perdido com a mudança da composição nutricional do meio em que se encontra a rizobactéria.

REFERÊNCIAS

AGROFIT– Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/> > acesso: 07/fevereiro, 2010.

AGUILAR, J. M. M.; ASHBY, A. M.; RICHARDS, A. J. M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M. D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, 1988. V. 134, p.2741-2746.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, n.2, p.173-181, 2008.

ALMEIDA, R. T. *Sclerotium rolfsii* Sacc. no Nordeste brasileiro. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 18, v. 1, p. 67-71, Jun. 1987.

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras:1ª ed., Editora UFLA, p.15-16, 2004.

ARORA, N. K.; KIM, M. J.; MAHESHWARI, D. K. Role of chitinase and beta-1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Microbiology**, Feb., v. 2, n. 53, p. 207-212, 2007.

ASHRAFUZZAMAN, M.; HOSSEN, F. A.; ISMAIL, M. R.; HOQUE, M. A.; ISLAM, M. Z.; SHAHIDULLAH, S.M. ; MEON, S. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology**, 06 Apr. 2009. v. 8, n. 7, p. 1247-1252.

BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; BLOEMBERG, G.; HOFTE, M.; LEMANCEAU, P.; COOKE B.M. (Eds.) **New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research**. Dordrecht: Springer, 364pp., 2007.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, n.3, v. 77, p. 549-579, 2005.

BARBOSA, R. N. T. **Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. Boa Vista, 2009, 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Federal de Roraima.

BAUTISTA, L. X. Z.; GALLARDO, I. R. **Estabilización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) em cultivos microbianos**. Bogotá, 2008. 140f. Tese (Doctorado en Microbiología

Agrícola y Veterinaria) - Facultad de Ciencias Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. Porto Alegre, 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças. **Documento**, Embrapa, n.15, 388f., 1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: Bettiol, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 187-208, 2009.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F. R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, Jan./Fev. 2003.

BLUM, L. E. B.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Powders of kudzu, velvetbean, and pine bark added to soil increase microbial population and reduce southern blight of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, Nov./Dez. 2006.

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

BRASIL, M. S. **Ocorrência e diversidade de genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. Seropédica, 2005, 136f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BULTREYS, A. Siderotyping, a tool to characterize, classify and identify fluorescent *Pseudomonads*. In: Varma, A.; Chincholkar, S. B. **Microbial Siderophores**, Berlin: Springer-Verlag, v.12, p. 67-89, 2007.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237–245, 2000.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5308-5319, Aug. 2007.

CARVALHO, G. A.; REIS, P. R.; MORAES, J. C.; FUINI, L. C.; ROCHA, L. C. D.; GOUSSAIN, M. M. Efeitos de alguns inseticidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p.1160-1166, Nov./Dez. 2002.

CARVALHO, G. A.; PARRA, J. R. P.; BAPTISTA, G. C. Efeito de produtos fitossanitários utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 nas gerações F₁ e F₂ em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 295-304, Mar./Abr. 2003.

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; KOZO, A.; LUMYONG, S. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Science and Technology Journal**, Jan./Jun. 2008. v. 8, n. 1, p. 18-23.

CHUANKUN, X.; MINGHE, M.; LEMING, Z.; KEQIN, Z. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, Yunnan, v. 36, p. 1997-2004, Jul. 2004.

CIPRIANO, M.A.P. **Potencial de *Pseudomonas* spp. na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico**. Campinas, 2009, 49f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas.

COELHO, L. F. **Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas**. Campinas, 2006, 50 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 1-10, Nov. 2009.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: Bettiol, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 224-237, 2009.

DANON, M.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Ascomycete communities associated with suppression of *Sclerotium rolfsii* in compost. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 20-30, 2010.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, Recife, v. 27, n. 5, Set./Out. 2002.

DAS, A.; PRASAD, R.; SRIVASTAVA, A.; GIANG, P. H.; BHATNAGAR, K.; VARMA, A. Fungal siderophores: structure, functions and regulation. In: Varma, A.; Chincholkar, S. B. **Microbial Siderophores**, Berlin: Springer-Verlag, v. 12, p. 1-40, 2007.

DEACON, J. W. **Modern mycology**. 3. ed. Cambridge: Blackwell Science, 303p., 1997.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTEF.; LACAVAL, P.T., SÁ, A.L.B.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, n. 7, p. 1305-1311, 2009.

DIMKPA, C. O.; SVATOS, A.; DABROWSKA, P.; SCHMIDT, A.; BOLAND, W.; KOTHE, E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, v. 74, p. 19–25, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA - CNPAB, 60 p.,1995.

DUARTE, M. L. R.; TABARANÃ, M. G. F.; ALBUQUERQUE, F. A. B. DE; MORAES, A. J. G. DE. Controle Químico da Podridão-das-estacas (*Sclerotium rolfsii*) da Pimenteira-do-reino. **Boletim Técnico**, Belém, Embrapa Amazônia Oriental, n. 157, Jun. 2006.

DUVAL, A. M. Q. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil**. Piracicaba, 2003, 111f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FARIAS, M. A. A.; LIMA, E. O.; PESSANHA, T. M. A. F.; SILVEIRA, N. F. C. ; SOUZA, A. E. F. Potencial antagônico de *Streptomyces* sp. no controle de fitopatógenos. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 124-129, 2009.

FARRAND, S.K.; VAN BERKUM, P.B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2003. V. 53, p. 1681-1687.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, D. J. H.; BARBOSA, J. G.; PEDROSA, A. W. Cultivo sucessivo de plantas de tomate oriundas de sementes e propagação vegetativa em sistema hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1013-1019, Jul. 2007.

FERNANDO, W. G. D.; RAMARATHANAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal

volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 955-964, 2005.

FERREIRA, E. P. B.; VOSS, M.; SANTOS, H. P.; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 2, p. 140-148, Abr./Jun. 2009.

FRANCESCHINI, M.; KOGLER, V.; SANTI, L.; GUIMARÃES, A. P.; SILVA, M. V.; VAINSTEIN, M. H.; CAMASSOLA, M.; DUTRA, V.; SCHRANK, A.; FRAZZON, A. P.; NAKAZOTO, L.; BARATTO, C. M.; CASTRO, L. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 23, p. 32-37, Nov./Dez. 2001.

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

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**, Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 1-20, 2007.

GANESAN, P.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 19, n. 1, p. 35-38, 1987.

GARCIA, F. A. O. **Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e promotores de crescimento em feijoeiro**. Viçosa, 2008, 132f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa.

GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. **Biochemical and Genetic Mechanisms used by Plant Growth Promoting Bacteria**, Imperial College Press: London, 1999.

GOMES, E. P. **Viabilidade de mudanças tecnológicas na irrigação da tomaticultura de mesa**. Campinas, 2005, 95f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Faculdade de Engenharia Agrícola - Universidade Estadual de Campinas.

GRONAU, I.; MORAN, S. Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. **Information Processing Letters**. v. 104, n. 6, p. 205-210, 2007.

Index Fungorum – Disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=309351>>
acesso: 04/março, 2010.

HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B. G. Siderophores in fungal physiology and virulence. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 46, p.87-149, 2008.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; MATTIONI, J. A. M. Doenças do Tomateiro no Estado de Roraima. **Documento**, Embrapa Roraima, n. 3, 31f., Jun. 2006.

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant Soil**, v. 316, p. 13–24, 2009.

HARTHMANN, O. E. L. **Microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola**. Curitiba, 2009, 117f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), setor de ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná.

HUANG, C. J.; WANG, T. K.; CHUNG, S. C.; CHEN, C. Y. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. **J. Biochemistry and Molecular Biology**, Jan. 2005. v. 38, n. 1, p. 82-88.

INDEX FUNGORUM : Disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?recordID=309351>>
acesso: 04/março, 2010.

JESUS JUNIOR, W. C. de; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; PEZZOPANE, J. E. M.; SANTIAGO, T. **Atualidades em Defesa Fitossanitária**, Alegre: Universidade Federal do Espírito Santo, p. 384-385, 2007.

JOHANSSON, P. M. **Biocontrol of *Fusarium* in wheat – Introducing bacteria to a system of complex interactions**. Uppsala, 2003, 74 p. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

JOSEPH, B.; RANJAN PATRA, R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, Sep. 2007. v. 1, n. 2, p. 141-152.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-979, 1970.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; SAMIYAPPAN, R. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. **Applied Soil Ecology**. v.45, n.2, p.71-77, 2010.

KHAN, A. A.; JILANI, G.; AKHTAR, M. S.; NAQVI, S. M. S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Pakistan, 2009. V. 1, n. 1, p. 48-58.

KIJINE, J. W.; SMIT, G.; DÍAZ, C. L.; LUGTENBERG, B. J. J. Lectin-enhanced accumulation of manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Jul. 1988. V.170, p. 2994-3000.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. Ed. Agronômicas Ceres, v. 2, 4ª ed., 623 p., 2005.

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

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: **International Conference on Plant Pathogenic Bacterial**. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacterial, Angers: INRA, p. 879-882, 1978.

KLOEPPER, J. W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Alabama, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KRONKA, A. Z. **Cancro bacteriano do tomateiro: Metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle**. Piracicaba, 2004, 79f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGET, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 199-228, 1989.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria, 2006, 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo - Universidade Federal de Santa Maria.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, Out. 2007.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p. 90-102, 2008.

LIU, B.; GUMPERTZ, M.L.; HU, S.; RISTAINO, J.B. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, n.9, p.2302-2316, 2007.

LOHMANN, T. R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J. R.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Paraná, v. 2, n. 2, p. 1665-1668, Out. 2007.

LUCON, C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 691-697, Jun. 2008.

LUZ, F. J. F.; SABOYA, R. C. C.; PEREIRA, P. R. V. S.; ALVES, A. B. O cultivo do tomate em Roraima. **Circular Técnica**, Embrapa Roraima, n. 6, 29f., Dez. 2002.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; POMELLA, A. W. V.; DE SOUZA, J. T. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicioso* by phylloplane actinomycetes. **Biological Control**, v. 47, p. 309-314, 2008.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 629-634, 2007.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, G. M. V.; MOUNTEER, A. H. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and *Eucalypts* species. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. Curitiba, 2005, 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência - Bioquímica), Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.

MANJULA, K.; GIRISH, A. G.; SINGH, S. D.; KISHORE, G. K. Combined Application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an Improved Biocontrol Activity Against Stem Rot in Groundnut. **Plant Pathology Journal**, Índia, 10/Jan. 2004, v. 20, n. 1, p. 75-80.

MANWAR, A.V.; KHANDELWAL, S.R.; CHAUDHARI, B.L.; MEYER, J.M.; CHINCHOLKAR, S.B. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, n. 1-3, p. 243-251, 2004.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARTINS, M. V. V.; SILVEIRA, S. F.; CARVALHO, A. J. C.; SOUZA, E. F. Erradicação de escleródios de *sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 421-424, Dez. 2003.

MEERA, M. S.; SHIVANNA, M. B.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. **Crop Protection**, v. 14, p. 123-130, 1995.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. **Controle Biológico de doenças**. Embrapa-CNPDA, p. 135-156, 1991.

MICHEL ACEVES, A. C.; OTERO SANCHEZ, M. A.; REBOLLEDO DOMINGUEZ, O.; LEZAMA GUTIERREZ, R.; OCHOA MORENO, M. E. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. em la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* in vitro. **Revista Chapingo**, México, Série Horticultura, v. 11, n. 2, p. 273-278, Jul./Dec. 2005.

MOHANDAS, S. Nitrogen fixation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby'). **Plant and Soil**, v. 107, p. 219-225, 1988.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, v. 159, p. 73-81, 2004.

NAHAS, E.; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 463-469, Set./Dez.1994.

NAKAYAMA, L. H. I.; CACERES, N. T.; ALCARDE, J. C.; MALAVOLTA, E. Eficiência relativa de fontes de fósforo de diferentes solubilizadores na cultura do arroz. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 463-469, May/Aug. 1998.

NAUE, C. R.; MOURA, A. B.; ROCHA, D. J. A. Controle da mancha bacteriana do tomateiro por rizobactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento. **XVII Congresso de iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação**, Nov. 2008.

NCBI - < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>> acesso: 04/Março, 2010.

OGER, R.; LOPEZ, M.; FARRAND, S. K. Iron-binding compounds from *Agrobacterium* spp: biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophores. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 654-664, 2001.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Documentos**, Jaguariúna, Embrapa Agrobiologia, n. 161, 40p., 2003.

OSBOURN, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1821-1831, 1996.

PÁDUA, R. R. DE; ALVARENGA, D. O. DE; QUEIROZ, P. R.; MELLO, S. C. M. DE. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 165, 23 p., 2007.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root. **Applied and Environmental Microbiology**, Ontario, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, Aug. 2002.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p.1921-1927, Sep./Ouc. 2008.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. Seropédica, 2007, 103f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 239-244, 2009.

POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BAREA, J. M. β -1,3-Glucanases activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. **Plant Science**, v. 141, p. 149-157, 1999.

PRESS, C. M., LOPER, J. E., KLOEPPER, J. W. Role of Iron in Rhizobacteria-Mediated Induced Systemic Resistance of Cucumber. **Biological Control**, v. 91, n. 6, p. 593-598, 2001.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 997-1004, Out. 2005.

RALSTON, D.B.; Mc BRIDE, R.P. Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant and Soil**, v. 45, p. 493-507, 1976.

REMUSKA, A. G.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **UEPG Ciências Exatas Terra**, Ponta Grossa, v. 13, n. 3, p. 31-36, Dez. 2007.

REN, L.; LI, G.; HAN, Y. C.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of β -1,3-glucanase of this mycoparasite. **Biological Control**, v. 43, p. 1-11, Jul. 2007.

RENSHAW, J. C.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J.; WIEBE, M. G.; LIVENS, F. R.; COLLISON, D.; TAYLOR, R. J. Fungal siderophores: structures, functions and applications. **Mycological Research**, v. 10, n. 106, p. 1123–1142, Oct. 2002.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R., COE, S. Assessment of *in vitro* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524-532, 1991.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Havana, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SA, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1201-1204, Set./Out. 2005.

ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógeno por eliciadores de natureza bacteriana. In: Bettioli, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 85-99, 2009.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Seropédica, 2007, 54f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SANTIN, R. C. M. **Potencial o uso de fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no controle de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. Porto Alegre, 2008, 92f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SANTOS, M.M.; CARVALHO, F.C.Q; FRANÇA, F.S.; DOURADO, D.L.; GUIMARÃES, L.; KARASAWA, M.; PAZ, C.D. Seleção de rizobactérias com a capacidade de promover crescimento em melancia (*Citrullus lanatus* L.). **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 1544-1548, Jul./Ag. 2008.

SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos e solarização para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. In: Bettioli, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 209-223, 2009.

SANTOS, M. C. M. **Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microrregião de Patos-PB**. Patos, 2009, 53f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvopastoris no Semi-Árido), Centro de saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal de Campina Grande.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: 3^a ed., APS, 2001.

SCHAFER, J. T.; MOURA, A. B.; ARDUIM, G. S.; GOMES, C. B.; CORREA, B. O.; SOARES, V. N. Avaliação do potencial de promoção de crescimento em plantas de figueira por bactérias selecionadas para o biocontrole do nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*). **XVII Congresso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação**, Nov. 2008.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, Jan./Fev. 2005.

SHALINI, S.; KOTASTHANE, A. S. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Índia, 2007. V. 6, n. 8, p. 2272-2281.

SILVA, A. C. M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. Cruz das Almas, 2007, 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, Jun. 2002.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S. & MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 42-46, 2003.

SILVEIRA, A. B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2008, 113f. Tese (Doutorado em Ciência), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVEIRA, A. A. **Análise genética e funcional de genes relacionados à captação de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii***. Porto Alegre, 2009, 93f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOUCHIE, E. L. **Microrganismos solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares em leguminosas fixadoras de N₂**. Seropédica, 2004, 122 f. Tese (Doutorado em Ciências em Agronomia), Instituto de Agronomia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, Nov. 2005.

SOUSA, C. S. **Streptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro**. Cruz das Almas, 2006, 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia.

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. Campinas, 2003, 47f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agrônomo de Campinas.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, O. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 283-320, 2009.

STAMFORD, N. P.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J. Microbiota dos Solos Tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**, Recife, p. 61-91, 2005.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p.12-22, 1982.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p.1596-1599, 2007.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, May. 1979.

TSVAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV, A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**. v. 162, n. 1, p. 69-76, 2007.

TU, C.C. & KIMBROUG, J.W. Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complexo **Botanical Gazette**, 139, p. 454-466, 1978.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Holanda, v. 255, p. 571-586, 2003.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**. v. 293, n. 1, p. 11-19, 2009.

WEBER, O. B.; FREIRE, F. C. O. Contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da bananeira: Perspectivas de utilização na produção integrada. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, n. 16, 29p., 2003.

WEBER, O. B.; TERAPO, D.; ROCHA, L. S.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S. Efeito de bactérias diazotróficas na produção de abacaxizeiro “cayenne champac”, sob irrigação, em dois níveis de adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 249-253, Ago. 2004.

WELLER, D. M.; ZABLOTOWICZ, R. Recent results from field and greenhouse trials on biological controls of diseases with obvious visual and typical symptoms. In: Kloepper, J. **First International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**. Orillia: Proceedings, p. 10-16, 1987.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Use of rhizobacteria for biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, p. 306-311, 1993.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 357-364, 2002.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* – a reply to Farrand et al. (2003). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p.1689-1695, 2003.

ZHENG, X. Y.; SINCLAIR, J. B. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. **Biocontrol**, v. 45, p. 223-243, 2000.

ANEXOS

Anexo A - Meio 523 (KADO e HESKETT, 1970)

- 10 g de sacarose
- 4 g de extrato de levedura
- 8 g de caseína ácida hidrolisada
- 2 g de K_2HPO_4 (anidro)
- 0,3 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- 15 g de agar
- 1000 mL de água destilada

Anexo B - Meio de BDA (Batata-Dextrose-Agar)

- 200 g de batata
- 20 g de dextrose (glucose)
- 15 g de agar
- 1000 mL de água destilada

Anexo C - Meio de B de King (KING et al., 1954)

- 20 g de peptona
- 10 mL de glicerol
- 1,5 g de K_2HPO_4
- 1,5 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- 16 g de agar
- 1000 mL de água destilada

Anexo D - Meio mineral de Renwick et al. (1991)

- 0,02 g de $CaCO_3$
- 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$

- 1,71 g de KCl
- 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 4,11 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 15 g de agar
- 1000 mL de água destilada

Anexo E - Meio TSBA merck

- 30 g de TSBA (agar triptona de soja)
- 15 g de agar
- 1000 mL de água destilada

Anexo F - Meio Agar-Água a 0,6%

- 0,6 g de Agar
- 100 mL de água destilada

Anexo G - Meio GL sólido

- 10 g de glicose
- 2 g de extrato de levedura
- 5 mL de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N de KOH)
- 15 g de agar
- 850 mL de água destilada

OBS: Ajustar o pH para 6,5 com NaOH.

Anexo H - Meio semi-sólido BMGM

- 1 g de glicose
- 2 g de ácido málico
- 1 g de manitol
- 0,4 g de K_2HPO_4

- 0,4 g de KH_2PO_4
- 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,02 g de CaCl_2
- 0,002 g de NaMoO_4
- 0,01 g de FeSO_4
- 2 g de agar
- 1000 mL de água destilada

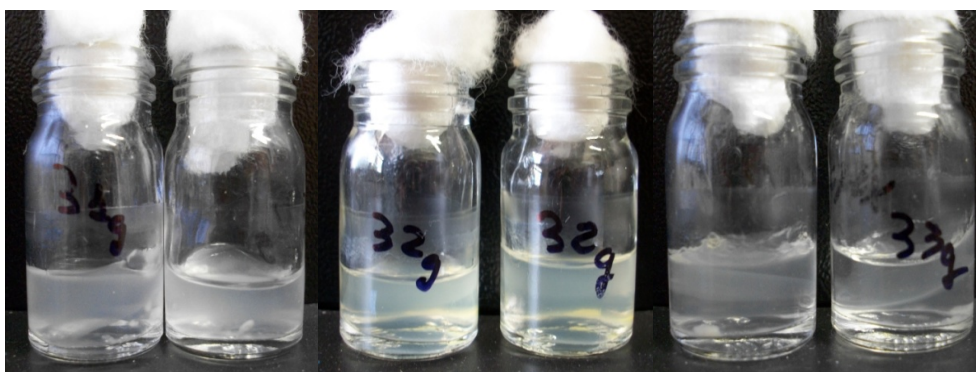
Anexo I - Meio DYGS líquido

- 2 g de glucose
- 2 g de ácido málico
- 1,5 g de peptona bacteriológica
- 2 g de extrato de levedura
- 0,5 g de K_2HPO_4
- 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 1,5 g de ácido glutâmico
- 1000 mL de água destilada

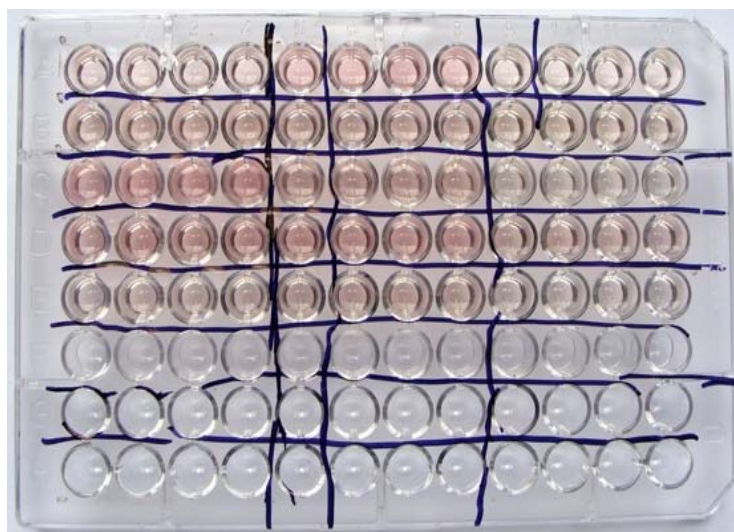
OBS: Ajustar o pH para 6,5 com NaOH.

APÊNDICES

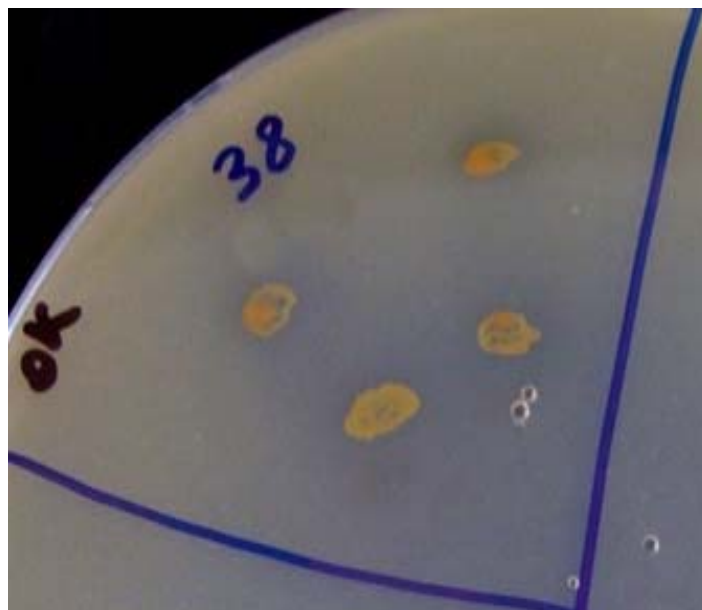
Apêndice A – Fotografia mostrando formação de película em meio de cultura BMGM semi-sólido; pelas rizobactérias 31223, 32238, 33282, confirmados em duas repetições.



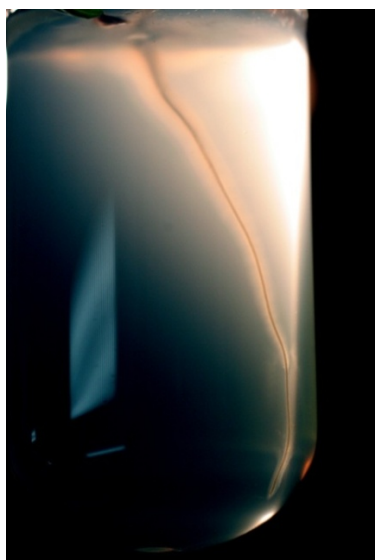
Apêndice B – Fotografia ilustrativa mostrando microplaca de poliestireno contendo poços onde é realizado o teste de produção do ácido indol acético, evidenciado pela coloração rósea.



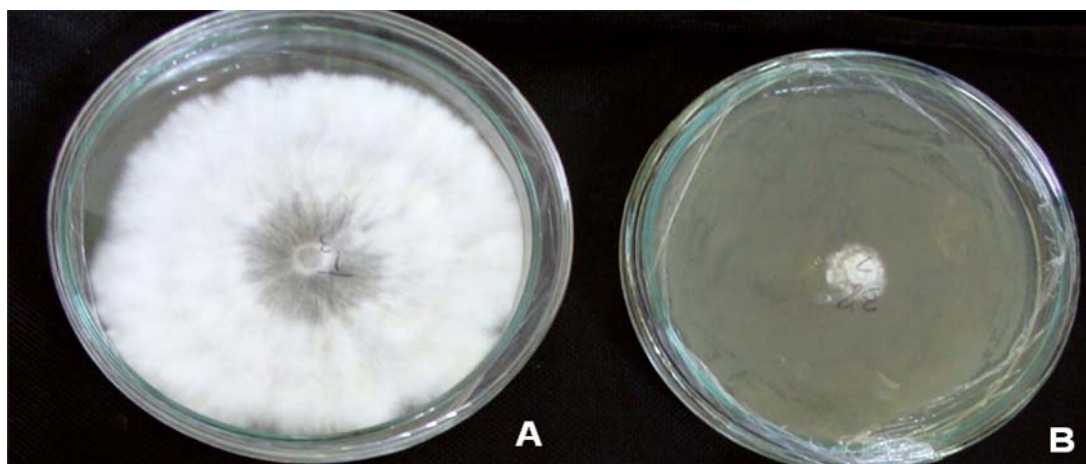
Apêndice C – Fotografia mostrando a solubilização de fosfato de cálcio pela formação de halo transparente ao redor da rizobactéria 38291. Placa contendo meio de cultura GL e fosfato de cálcio precipitado.



Apêndice D – Fotografia mostrando tubo de ensaio contendo agar-água (0,6%) em que se observa colonização de raiz pela rizobactéria, evidenciado por crescimento leitoso na rizosfera.



Apêndice E – Fotografia mostrando a inibição do crescimento micelial do isolado de *S. rolfsii* 258 por difusão de compostos em meios de cultura onde: (A) testemunha e (B) rizobactéria 38291.



Apêndice F - Inibição do crescimento micelial do isolado de *S. rolfsii* 258 por meio da produção de sideróforo pela rizobactéria 32238 (B), sem suplementação de ferro e com suplementação de ferro; em comparação com a testemunha (A), com suplementação de ferro e sem suplementação de ferro, respectivamente.

