

# Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias

Cleusa Maria Mantovanello Lucon<sup>(1)</sup>, Milena Apetito Akamatsu<sup>(1)</sup> e Ricardo Harakava<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, nº 1.252, CEP 04014-002 São Paulo, SP. E-mail: mantova@biologico.sp.gov.br, miakamatsu@gmail.com, harakava@biologico.sp.gov.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias, no crescimento de plântulas de pepino e no controle de tombamento, causado por *Pythium aphanidermatum*. Foram realizados em laboratório ensaios de: degradação de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC); colonização das raízes de plântulas de pepino; e pareamento de culturas. A identificação dos melhores isolados foi feita pela determinação das seqüências do gene 16S rDNA. Trinta e sete isolados, dos 165 testados, aumentaram a massa de matéria seca das plantas de pepino em até 63%. Desses, somente um isolado (N13 – *Pseudomonas fluorescens*) reduziu o tombamento de plântulas em 25%; 21 isolados inibiram o crescimento micelial de *P. aphanidermatum*, colonizaram o sistema radicular das plantas de pepino e cresceram em presença de ACC como única fonte de nitrogênio. Dos dez isolados que apresentaram resultados satisfatórios, cinco foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, quatro *Pseudomonas* e um *Stenotrophomonas*. Dos 165 isolados de rizobactérias testados, sete possuem potencial para promover o crescimento de plantas de pepino e um para controlar o tombamento causado por *P. aphanidermatum*.

**Termos para indexação:** *Pythium aphanidermatum*, ACC, colonização de raiz, controle biológico.

## Growth promotion and damping-off control of cucumber seedling by rhizobacteria

**Abstract** – The aim of this work was to evaluate the rhizobacteria effect on cucumber seedling growth and in the control of damping-off disease *Pythium aphanidermatum*. In laboratory, the following tests were carried out: degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC); colonization of cucumber root system; and, the capacity to antagonize the pathogen. The best isolates were identified through determination of 16S rDNA gene sequences. Thirty-seven isolates, among 165 tested, enhanced the dry weight of cucumber plants in up to 63%. From these 37, only one isolate (N13 – *Pseudomonas fluorescens*) reduced the incidence of pre-emergence damping-off disease by 25%; 21 isolates antagonized *P. aphanidermatum* in vitro, colonized the cucumber roots, and degraded ACC, as the only source of nitrogen. Out of ten most effective isolates, five were identified as members of the genus *Bacillus*, four of *Pseudomonas* and one of *Stenotrophomonas*. Out of the 165 tested rhizobacteria isolates, seven have potential to promote cucumber plant growth, and one to control *P. aphanidermatum* damping-off disease.

**Index terms:** *Pythium aphanidermatum*, ACC, root colonization, biological control.

### Introdução

As podridões de raízes e de colos de plantas encontram-se entre os problemas fitossanitários de maior importância mundial. Vários são os fitopatógenos de solo associados às podridões e ao tombamento de plântulas, e algumas espécies do gênero *Pythium* estão entre as mais preocupantes, pois estão amplamente distribuídas e afetam uma grande variedade de culturas de importância econômica (Martin & Loper, 1999). Quando as condições ambientais encontram-se favoráveis aos

patógenos e adversas às plantas, esses podem causar grandes prejuízos aos produtores, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura (Kucharek, 2000; Tanaka et al., 2003).

As cucurbitáceas, principalmente o pepino, são bastante suscetíveis ao ataque de *Pythium* spp.; em condições de temperaturas mais elevadas, a espécie *P. aphanidermatum* é encontrada com grande frequência (Kucharek, 2000).

Tradicionalmente, para o controle do tombamento de plântulas, os produtores utilizam fungicidas protetores e

fazem a desinfestação química do substrato de crescimento das plantas (Ben-Yephet et al., 1999; Georgakopoulos et al., 2002). Todavia, o elevado custo dessas práticas, associado ao surgimento de patógenos resistentes aos produtos químicos comumente empregados, bem como a proibição do uso de outros, tal como o brometo de metila, torna essencial o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle.

O uso de rizobactérias, seja diretamente como promotoras de crescimento, seja como agentes de controle biológico de fitopatógenos, é considerado uma excelente alternativa para a redução ou substituição do uso de produtos químicos sintéticos, na produção de alimentos (Freitas & Aguilar-Vildoso, 2004).

Os agentes biocontroladores exercem efeito benéfico sobre as plantas, por diferentes mecanismos de ação, diretos ou indiretos, tais como competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência (Ramamoorthy et al., 2001; Whipps, 2001).

Bactérias isoladas da rizosfera e rizoplasma de plantas são bastante estudadas, porque promovem o crescimento das plantas e controlam fitopatógenos de solo, pois são capazes de crescer e colonizar rapidamente o sistema radicular, que é o sítio de infecção desses patógenos (Pal & McSpadden Gardener, 2006).

Quanto aos mecanismos de promoção de crescimento das plantas por rizobactérias, pode-se destacar a produção de antibióticos, sideróforos e outras substâncias que podem inibir fungos fitopatogênicos (Haas & Défago, 2005; Pal & McSpadden Gardener, 2006).

Muitas espécies de microrganismos têm sido testadas como agentes potenciais para biocontrole, inclusive as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (Chanway et al., 2000; Chen et al., 2000; Ramamoorthy et al., 2001; Freitas & Aguilar Vildoso, 2004; Orhan et al., 2006).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de rizobactérias, no crescimento de plântulas de pepino e no controle de *Pythium aphanidermatum*, em ensaios realizados in vivo e in vitro.

## Material e Métodos

O isolamento de bactérias foi realizado a partir do rizoplasma de diferentes hortaliças e de algumas amostras de solo coletadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Um grama de raízes ou solo, de cada amostra, foi transferido para tubos de ensaio, com 9 mL de solução salina esterilizada (0,85%), e foi submetido ao ultra-som

por 1 min. Da suspensão obtida, foram feitas diluições seriadas com o plaqueamento de 100 µL nos meios nutriente ágar (NA) e B de King (KB). Os meios infectados foram incubados por 48 horas à temperatura ambiente. As colônias que apresentaram diferentes características morfológicas – forma, coloração, textura – foram purificadas e armazenadas a 4°C até serem utilizadas. Os isolados que tiveram resultados efetivos nos ensaios subsequentes foram preservados pelos métodos de liofilização e de congelamento em glicerol 20% a -80°C.

Sementes de pepino da cultivar caipira verde foram lavadas por uma hora em água corrente, para retirada do fungicida protetor, secadas e infectadas, por imersão nas suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), por 30 min sob agitação. As sementes do tratamento-controle foram imersas, pelo mesmo período, em solução salina esterilizada.

Sementes de pepino foram tratadas com as suspensões dos isolados bacterianos e plantadas em sacos de plástico perfurados, com 500 g do substrato comercial Biomix, com 25 plantas por tratamento. As plantas foram mantidas em condição de casa de vegetação, por duas semanas depois da germinação das sementes; a avaliação foi feita pela obtenção da massa da matéria seca (MMS) da parte aérea das plantas. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, cinco plantas por repetição e 165 tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O potencial no controle de sintomas, causados por *P. aphanidermatum*, de 37 isolados que apresentaram resultados satisfatórios para a promoção de crescimento de plantas de pepino, foi verificado por meio de dois tipos de ensaio. No primeiro, foi utilizada a técnica do corte do hipocótilo, em que plântulas de pepino com 2–3 folhas verdadeiras foram cortadas na base, a região seccionada foi imersa por 30 min na suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), e o plantio do hipocótilo foi feito em substrato comercial Biomix infestado com o patógeno. Dois tipos de controle foram utilizados, um com plantas mergulhadas em água destilada esterilizada (ADE), plantadas em solo infestado, e o outro com as plantas tratadas com ADE, plantadas em substrato não infestado com o patógeno. No segundo ensaio, as rizobactérias foram aplicadas às sementes e a semeadura foi feita em substrato comercial infestado com o patógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco plantas ou dez sementes por tratamento e cinco repetições. A avaliação dos dois experimentos foi realizada após duas semanas, pela contagem do número de plantas sobreviventes e de sementes de pepino germinadas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram testados 37 isolados de rizobactérias em *P. aphanidermatum*, in vitro, pela técnica de pareamento de culturas, com três repetições. As bactérias testadas foram colocadas, com auxílio de palito de dente esterilizado, em três pontos equidistantes, nas extremidades de placas de Petri com meio BDA e B de King. Incubaram-se por 24 horas a 27°C e, após esse período, discos de meio BDA, com as estruturas do patógeno, foram depositados no centro das placas. A avaliação foi feita cinco dias depois, pela medida, em centímetros, do raio do halo de inibição do patógeno. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Vinte e um isolados – A23, B7, C2, CR14, F21, F22, N8, N13, P10, R4, R6, R17, RP4, PC12, PPB, SA8, SA23, SA27, SA28, SA29, SA30 –, que apresentaram aumento acima de 20% na MMS, foram testados quanto à capacidade de colonização de raízes de plântulas de pepino. Sementes tratadas com as suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), por 30 min sob agitação, foram depositadas dentro de tubos de ensaio (3x25 cm), na superfície de 20 mL de meio ágar-água (AA), com uma semente por frasco e cinco repetições. A incubação foi feita em estufa (tipo BOD), regulada para 27°C, equipada com lâmpadas fluorescentes de luz branca e fria, com fotoperíodo de 8:16 horas (luz:escuro). Após esse período, a confirmação da colonização do sistema radicular das plântulas de pepino foi feita visualmente, pela observação do crescimento dos isolados na superfície da raiz e, também, pela deposição do sistema radicular, depois de removido cuidadosamente do meio AA, sobre meio NA em placas de Petri.

A capacidade de crescimento dos 21 isolados, em meio mínimo, com ACC como única fonte de N, foi testada no ensaio que teve como testemunha dois isolados fitopatogênicos de bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. O meio utilizado foi o descrito por Glick et al. (1995), com a seguinte composição: 4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mg de

MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 70 mg de ZnSO<sub>4</sub>, 1 mg de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mg de CuSO<sub>4</sub>, 2 g de glicose, 10 mg de MoO<sub>3</sub>, 2 g de ácido glucônico, 2 g de ácido cítrico, 3 mM de ACC e 1 L de água destilada.

A capacidade de crescimento dos isolados, em presença de ACC, foi verificada em meio líquido e sólido, pela incubação por 48 e 72 horas, respectivamente, a 27°C. A avaliação dos resultados em meio líquido foi feita pela medida da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro, por comparação da leitura final (48 horas) com a do tempo zero e, em meio sólido, pela visualização e comparação do tamanho da colônia da bactéria, com três repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foi realizada a identificação molecular dos dez isolados que apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios anteriores – R17, R4, N13, CR14, J3, B7, C2, R6, P10 e RP4 –, por meio da extração de DNA pela técnica de fervura. Células bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrífuga (1,5 mL), com 500 µL do tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100), e esses frascos foram colocados em banho-maria a 100°C, por 10 min. A seguir foi feita uma centrifugação, e o sobrenadante foi utilizado para a amplificação do gene 16S rDNA dos isolados, pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), com os iniciadores PHR (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG AC 3') e PAF (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') (Edwards et al., 1989). O produto dessa reação foi purificado com "QIAquick PCR purification" e utilizado na reação de seqüenciamento, por meio dos iniciadores já mencionados, do reagente Big Dye terminator e do seqüenciador automático ABI377. As seqüências obtidas foram comparadas no GenBank, com auxílio do programa BLAST.

## Resultados e Discussão

Entre os 165 isolados testados, quanto ao efeito no crescimento de plântulas de pepino, 37 causaram aumentos na massa de matéria seca (MMS) das plantas. Os melhores isolados foram: R6, P10, R4, R17 e F22, com aumentos superiores a 25% (Tabela 1). Aumentos na massa de matéria seca de pepino foram observados por Silveira et al. (2004), que constataram 55,5% de aumento com o isolado de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Além do aumento causado por 22% dos isolados testados, observou-se que 30% dos isolados causaram redução na MMS. Esses efeitos também foram constatados por outros pesquisadores, nas culturas de ervilha e tomate (Berggren et al., 2001; Jagadeesh et al., 2006). A habilidade de algumas rizobactérias de promover o crescimento de plantas tem sido bastante estudada, principalmente em relação a *Pseudomonas* e *Bacillus* spp. (Ryder et al., 1999; Kurek & Jaroszuk-S' Cisel, 2003; Egamberdieva et al., 2008).

Não houve especificidade entre os isolados utilizados; isolados obtidos de rizosfera de outras plantas apresentaram capacidade de promoção de crescimento em plantas de pepino. O mesmo fato foi observado por Sottero (2003), com isolados da rizosfera de diferentes culturas, que foram eficientes em promover o crescimento de alface.

O aumento no crescimento pode ser resultado de mecanismos diretos ou indiretos de ação, tais como produção de fitormônios, aumento na disponibilidade e absorção de nutrientes e supressão de fitopatógenos (Cattelan et al., 1999; Whipps, 2001; Jagadeesh et al., 2006; Egamberdieva et al., 2008), enquanto as bactérias deletérias afetam negativamente as plantas, pela produção de fitotoxinas, alteração na disponibilidade de água, íons e substâncias promotoras de crescimento de plantas (Jagadeesh et al., 2006).

Dos 37 isolados testados para o controle de *P. aphanidermatum*, nos dois tipos de ensaios realizados, apenas o isolado N13 conseguiu reduzir em 25% os sintomas de tombamento pré-emergência de plântulas de pepino, no ensaio em que as sementes foram tratadas com as rizobactérias. Os demais tratamentos resultaram em aproximadamente 100% de tombamento das plântulas. No ensaio em que o hipocótilo das plantas foi seccionado, imerso na suspensão bacteriana e plantado em solo infestado com o patógeno, nenhuma das plantas conseguiu sobreviver. A exposição direta dos tecidos tenros das plantas jovens ao patógeno, normalmente bastante suscetíveis ao seu ataque, aumentou a incidência da doença. Segundo Sutton et al. (2006), *P. aphanidermatum* é um patógeno bastante eficiente em causar sintomas de tombamento em plântulas, inclusive ao pepino, por ser capaz de penetrar por ferimentos ou superfícies intactas, pois formam apressórios ou estruturas similares a apressórios. Esses mesmos autores mencionam que os nutrientes liberados pelas plantas influenciam diretamente a infecção pelo

patógeno. Outro fator que colaborou para a alta incidência da doença foi a realização dos ensaios no verão, uma vez que temperaturas elevadas, entre 30 e 35°C, foram ideais para o crescimento do isolado de *P. aphanidermatum* utilizado, conforme constatado por Lucon & Ichikawa (2005). Além do crescimento, a temperatura também influencia a agressividade do patógeno, conforme constatado por Al-Sa'di et al. (2007).

Quanto aos resultados do teste do pareamento de culturas, dos 37 isolados testados 21 (57%) inibiram o crescimento do patógeno, com raios de inibição de 0,1 a 0,57 cm, mas somente oito inibiram de forma significativa, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 1). O isolado N13, que se destacou no ensaio in vivo, no ensaio in vitro não apresentou resultado significativo, o que confirma os dados da literatura, em que um isolado pode apresentar comportamentos diferenciados in vitro e in vivo (Freitas & Pizzinatto, 1991). Três desses isolados, P10, R17 e R6, foram responsáveis por aumentos no crescimento das plantas, conforme apresentado anteriormente. A produção de compostos inibitórios por agentes de biocontrole pode ter um papel importante no controle de patógenos da rizosfera, o que leva ao maior desenvolvimento das plantas (Whipps, 2001).

**Tabela 1.** Efeito da aplicação de rizobactérias em sementes de pepino, no crescimento de plântulas em condições de casa de vegetação, médias do raio do halo de inibição do ensaio in vitro, rizobactéria versus *Pythium aphanidermatum*, em meio BDA, e efeito da adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), em meio mínimo no crescimento de rizobactérias, medido por densidade ótica a 595 nm, após 72 horas<sup>(1)</sup>.

Isolado	Matéria seca (%)	Raio do halo de inibição (cm)	Densidade ótica (595 nm)
Controle	0d	0,00e	0,000b
R4	52ab	0,35abc	0,214a
R17	58a	0,57ab	0,036b
R6	38bc	0,27bcd	0,032b
CR14	20c	0,00e	0,011b
P10	49ab	0,57a	0,005b
RP4	20c	0,13cd	0,004b
J3	22c	0,13cd	0,003b
B7	21c	0,10d	0,037b
C2	23c	0,27bcd	0,007b
N13	25c	0,20cd	0,025b
F22	63a	0,00e	0,008b

<sup>(1)</sup>Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



No ensaio de colonização de raízes de plantas de pepino, os 21 isolados testados colonizaram vigorosamente o sistema radicular de plântulas, o que foi evidenciado pela presença de uma área túrbida e leitosa próxima à raiz, o que indica a capacidade desses isolados em utilizar apenas os exsudados liberados pelas raízes, como fonte de nutrientes, uma vez que o substrato de crescimento foi o meio ágar-água. Constatou-se, também, a não especificidade dos isolados, pois foram obtidos de diferentes culturas de plantas, tais como citros, repolho, rabanete, alface e ornamentais. Estes resultados corroboram as observações feitas por Queiroz et al. (2006), que testaram a aplicação de sete isolados de rizobactérias *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Paenobacillus* e *Serratia*, obtidos da rizosfera de feijoeiro, cenoura e citros, em sementes de limoeiro-cravo, e constataram que todos os isolados colonizaram o sistema radicular de forma abundante ou intermediária, independentemente da cultura de onde foram obtidos. Whipps (2001) menciona, em sua revisão, a importância da colonização rizosférica de plantas, para a supressão de doenças causadas por fitopatógenos de solo. Segundo Compant et al. (2005), a competição por nutrientes e nichos na superfície das raízes é considerado como um dos principais mecanismos utilizados por rizobactérias, na proteção das plantas contra os fitopatógenos.

Na Tabela 1, pode ser observado o desempenho de seis isolados, dos 21 testados, que cresceram em meio líquido e sólido com ACC como única fonte de N, o que indica a capacidade de produção da enzima ACC desaminase pelos isolados, embora o aumento na absorvância, após 48 horas de incubação, só tenha sido significativo para a rizobactéria R4, com 120%. Na comparação desses resultados com os do ensaio de promoção de crescimento, verificou-se que vários dos isolados capazes de crescer em presença de ACC também promoveram o aumento na MMS de plantas de pepino, e os isolados R4, R6 e R17 se destacaram em ambos. A produção da enzima ACC desaminase por rizobactérias ajuda a manter o crescimento e desenvolvimento de plantas sob condições de estresse, mesmo durante as infecções causadas por fitopatógenos (Saleem et al., 2007). Essa enzima tem por função catalisar a clivagem hidrolítica do ACC, molécula precursora do etileno, o que causa diminuição no seu nível e, por consequência, maior crescimento das raízes em comprimento (Glick et al., 1998).

Os dez isolados bacterianos, que apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios anteriores, foram identificados pelo DNA extraído pela técnica de fervura, o que permitiu também a posterior amplificação do gene 16S. O tamanho dos produtos de PCR visualizados em gel de agarose, sob luz UV, depois de corados com brometo de etídeo, foi de aproximadamente 1.500 pb, quando comparadas ao marcador 1 kb, o que concorda com o encontrado por Ramírez-Moreno et al. (2003). Segundo Louws et al. (1999), a análise da sequência do gene 16S rDNA tem provado ser efetiva na classificação de microrganismos. Este gene é o mais amplamente utilizado, por possuir regiões bem conservadas, interespaçadas com trechos hipervariáveis e variáveis, o que o torna conveniente para o desenho de iniciadores (García-Martínez et al., 1999). A taxonomia de bactérias, baseada na filogenia do gene 16S rDNA, é bastante utilizada pelo grande número de sequências encontradas em bancos de dados disponíveis na internet, o que facilita o encontro de parentes adequados ou mesmo dos microrganismos mais próximos, de acordo com os valores filogenéticos, e indica semelhanças prováveis nos comportamentos fisiológicos (Ludwig & Klenk, 2001; Gupta & Griffiths, 2002). O sequenciamento do gene 16S dos melhores isolados – R4, N13, Cr14, J3, B7,C2, RP4, R17, P10 e R6 – permitiu, após comparação com as sequências encontradas no GenBank, de acordo com a ordem apresentada, encontrar os seguintes resultados: *Stenotrophomonas maltophilia*, 90%; *Pseudomonas fluorescens*, 98%; *P. pannoniae*, 96%; *Bacillus subtilis*, 98%; *B. cereus* (isolado B7), 98%; *B. pumilus*, 98%; *B. cereus* (isolado RP4), 95%; *P. putida*, 90%; *B. mojavensis*, 96%; *P. corrugata*, 89%. Observou-se que entre os 10 isolados identificados, a grande maioria pertence aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, muito conhecidos e utilizados no controle biológico de doenças em todo o mundo (Compant et al., 2005).

## Conclusões

1. Dos 165 isolados testados, 22% são capazes de promover aumentos superiores a 20% no crescimento de plantas de pepino.
2. Somente o isolado N13 de *Pseudomonas fluorescens* tem potencial para reduzir o tombamento de plantas de pepino, causado por *Pythium aphanidermatum*, diferentemente do antagonismo in vitro.

3. Todos os isolados testados têm capacidade de colonizar vigorosamente o sistema radicular de plântulas de pepino.

4. Apesar de a capacidade de crescer na presença de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) só ser significativa para a rizobactéria R4, em comparação com a promoção de crescimento, os isolados R6 e R17 também se destacam em ambas as variáveis.

5. Os isolados com os melhores desempenhos nos ensaios são 50% do gênero *Bacillus* e 40% do gênero *Pseudomonas*.

## Referências

- AL-SA'DI, A.M.; DRENTH, A.; DEADMAN, M.L.; COCK, A.W.A.M.; AITKEN, E.A.B. Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. **Plant Pathology**, v.56, p.140-149, 2007.
- BEN-YEPHET, Y.; NELSON, E.B. Differential suppression of damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, and *P. myriotylum* in composts at different temperatures. **Plant Disease**, v.83, p.356-360, 1999.
- BERGGREN, J.W.; VAN VUURDE, L.; MARTENSSON, A.M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. **Applied Soil Ecology**, v.17, p.97-105, 2001.
- CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v.63, p.1670-1680, 1999.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p.13-23, 2000.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4951-4959, 2005.
- EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.7843-7853, 1989.
- EGAMBERDIEVA, D.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; GAFUROVA, L.; KUCHAROVA, Z.; LUGTENBERG, B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v.10, p.1-9, 2008.
- FREITAS, S.S.; AGUILAR VILDOSO, C.I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.
- FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.17, p.105-112, 1991.
- GARCÍA-MARTINEZ, J.; ACINAS, S.G.; ANTÓN, A.I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of 16-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.36, p.55-64, 1999.
- GEORGAKOPOULOS, D.G.; FIDDAMAN, P.; LEIFERT, C.; MALATHRAKIS, N.E. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1078-1086, 2002.
- GLICK, B.R.; KARATUROVÍČ, D.M.; NEWELL, P.C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.533-536, 1995.
- GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.190, p.63-68, 1998.
- GUPTA, R.S.; GRIFFITHS, E. Critical issues in bacterial phylogeny. **Theoretical Population Biology**, v.61, p.423-434, 2002.
- HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.307-319, 2005.
- JAGADEESH, K.S.; KRISHNARAJ, P.U.; KULKARNI, J.H. Suppression of deleterious bacteria by rhizobacteria and subsequent improvement of germination and growth of tomato seedlings. **Current Science**, v.91, p.1458-1459, 2006.
- KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. In: **Plant pathology fact sheet PP53**. Gainesville: Institute of Food and Agriculture Service, 2000.
- KUREK, E.; JAROSZUK-S'CISEL, J. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. **Biological Control**, v.26, p.48-56, 2003.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J. de. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.81-125, 1999.
- LUCON, C.M.M.; ICHIKAWA, A.I. Efeito da temperatura e de diferentes substratos no crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.10, 2005.
- LUDWIG, W.; KLENK, H. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's: manual of systematic bacteriology**, 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p.49-65.

- MARTIN, F.N.; LOPER, J.E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, p.111-181, 1999.
- ORHAN, E.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.38-43, 2006.
- PAL, K.K.; McSPADDEN GARDENER, B. **Biological control of plant pathogens**. 2006. Disponível em: <http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/>. Acesso em: 20 jan. 2008.
- QUEIROZ, B.P.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MELO, I. Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias. **Summa Phytopathologica**, v.32, p.95-97, 2006.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.
- RAMÍREZ-MORENO, S.; MARTÍNEZ-ALONSO, M.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; ESTEVE, I.; GAJU, N. Seasonal population changes in the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified 16S rRNA genes of predominant ribotypes in microbial mat samples from the Ebro Delta (Spain). **Current Microbiology**, v.46, p.190-198, 2003.
- RYDER, M.H.; YAN, Z.; TERRACE, T.E.; ROVIRA, A.D.; TANG, W.; CORRELL, R.L. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.19-29, 1999.
- SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.635-648, 2007.
- SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.M.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.217-221, 2004.
- SOTTERO, A.N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 2003. 62p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônômico, Campinas.
- SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOING, T.N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J.C.; BENCHIMOL, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, v.32, p.307-321, 2006.
- TANAKA, M.A.S.; ITO, M.F.; BRAGA, C.A.S.; ARMOND, G. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.386-393, 2003.
- WHIPPS, J.M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

Recebido em 13 de dezembro de 2007 e aprovado em 29 de maio de 2008