

IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO ^{1,2*}
ELINEIDE BARBOSA DA SILVEIRA ³
SAYONARA MARIA PAULINO DE ASSIS ¹
ANDRÉA MARIA ANDRÉ GOMES ³
ANA ROSA PEIXOTO NASCIMENTO ¹
VIRGINIA MARIA TENÓRIO SABINO DONATO ¹

1. Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, e-mail: rmariano@truenet.com.br.

2. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco.

3. Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

*Bolsista CNPq.

RESUMO

IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são residentes epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que atuam diretamente promovendo o crescimento ou indiretamente como agentes de controle biológico de doenças de plantas. Os efeitos benéficos das BPCP podem ser observados em plantas propagadas “in vitro” e “ex vitro” principalmente pelo aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas e matéria seca, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade. As BPCP endofíticas têm grande potencialidade e praticabilidade de uso. As principais BPCP empregadas na agricultura são espécies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter* e *Enterobacter cloacae*, entre outras. Nesta revisão são discutidos os problemas e soluções relacionadas à pesquisa deste importante grupo de bactérias visando a maximização da produção de alimentos com manutenção do equilíbrio ecológico.

Termos para indexação: BPCP, controle biológico, bactérias endofíticas, micropropagação.

ABSTRACT

IMPORTANCE OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA FOR A SUSTAINABLE AGRICULTURE

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are epiphytic or endophytic resident, non

pathogenic bacteria that act directly promoting plant growth or indirectly as disease biocontrol agents. Their beneficial effects may be observed in “in vitro” propagated plants and also “ex vitro” mainly through the increase of foliar area, plant height, stem diameter, leaf number and dry matter, reduction of the acclimation time, higher plant survival, disease biocontrol and higher yield. The endophytic PGPR has great potential and practical use. The main PGPR utilized in agriculture are species of *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* and *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter* and *Enterobacter cloacae*, among others. This review discusses problems and solutions related to research on this important group of bacteria aiming to maximize food production maintaining the ecological balance.

Index terms: PGPR, biocontrol, endophytic bacteria, micropropagation.

I. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita. Já existem diversos produtos biológicos a base de BPCP sendo comercializados no mundo e nos Estados Unidos (Tabela 1) embora no Brasil ainda não exista registro para nenhum deles.

Tabela 1. — Produtos biológicos a base de bactérias registrados para uso nos Estados Unidos (APS Biological Control Committee, 2003)

Produto	Organismo	Organismo-alvo	Fabricante
Actinovate	<i>Streptomyces hydicus</i>	Doenças causadas por patógenos habitantes do solo	Natural Ind., Inc. (USA)
BioJect Spot-Less	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Pythium aphanidermatum</i>	EcoSoil Systems, Inc (USA)
Bio-Save 10LP Bio-Save 110	<i>P. syringae</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor pyriformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	EcoScience Corp. (USA)
BlightBan A506	<i>P. fluorescens</i> , A506	<i>Erwinia amylovora</i> e bactérias nucleadoras de gelo (INA ⁺)	NuFarm Inc. (USA)
Cedomon	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Manchas foliares de cereais, <i>Fusarium</i> sp.	BioAgri AB (Suécia)
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GBO3, <i>Bacillus</i> spp.	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Phytophthora</i>	Growth Products (USA)
Deny	<i>Burkholderia cepacia</i> Tipo Wisconsin	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. E alguns nematóides	Stine Microbial Products (USA)
EcoGuard	<i>B. licheniformis</i> SB 3086	<i>Sclerotinia homeocarpa</i> em gramados	Novozymes Biologicals, Inc. (USA)
Galltrol	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AgBiochem, USA
HiStick N/T	<i>B. subtilis</i> MBI600 + <i>Rhizobium</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Aspergillus</i>	Becker Underwood (USA)
Intercept	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	Soil Technologies Corp. (USA)
Kodiak (várias formulações)	<i>B. subtilis</i> GBO3	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp.	Gustafson, Inc, USA
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviride</i> K61	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	Kemira Agro Oy (Finlândia)

Tabela 1. — Continuação...

Nogall	<i>A. radiobacter</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Bio-care technology, Austrália
Rhizo-Plus	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Streptomyces scabies</i>	KFZB Biotechnik GmbH (Alemanha)
Serenade	<i>B. subtilis</i> QWT713	Míldio, oídio, mancha de Cercospora, queima da macieira e outros	Agra Quest, Inc. (USA)
Subtilex	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp	Becker Underwood (USA)
YieldShield	<i>B. pumillus</i> GB34	Doenças causadas por patógenos habitantes do solo	Gustafson Inc. (USA)

As BPCP atuam promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes, entre outros (Conn *et al.*, 1997; Lazarovits & Nowak, 1997). A promoção de crescimento é considerada indireta quando a planta está sendo infectada por um patógeno e as BPCP atuam como agentes de controle biológico através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe⁺³ e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada. As principais BPCP são encontradas entre as *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e fluorescentes; espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*; *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia*, entre outras.

Na China, as BPCP são conhecidas e comercializadas como bactérias que aumentam a produtividade (YIB) (Klopper, 1997) e em 1987 já eram aplicadas em larga escala, em 48 diferentes culturas, atingindo 3,35 milhões de hectares (Wenhua & Hetong, 1997). Nesse país, aumentos de produtividade tão significativos como 23,1 e 22,5 % têm sido obtidos pela aplicação dessas bactérias respectivamente em batata doce e batata (Zhang *et al.*, 1996).

O controle biológico no Brasil iniciou na década de 40 mas o biocontrole com bactérias é mais recente. Existem várias revisões sobre o assunto embora sem especificar agentes bacterianos de biocontrole (Bettiol, 1996, 1997; Luz, 1993b; Mariano, 1993; Michereff & Mariano, 1993). O livro organizado por Bettiol publicado em 1991 (Bettiol, 1991) foi muito importante na história do biocontrole de doenças de plantas no Brasil, e incluiu um capítulo sobre bactérias como antagonistas (Robbs, 1991). O interesse em BPCP no Brasil foi posteriormente estimulado pela apresentação de palestra no XXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia em 1995 pelo Prof. J. W. Klopper e publicação de uma revisão sobre este assunto na RAPP-Revisão Anual de Patologia de Plantas (Luz, 1996). Os primeiros trabalhos realizados em BPCP no Brasil (Stein, 1988; Freitas, 1989) testaram *Pseudomonas* fluorescentes para aumentar o crescimento de plântulas de tomateiro e cafeeiro em condições de casa de vegetação. Desde então, vários estudos têm avaliado o efeito benéfico da utilização dessas bactérias.

2. UTILIZAÇÃO DE BPCP NA PROPAGAÇÃO POR SEMENTES E ÓRGÃOS DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA “EX-VITRO”

Serão aqui abordadas, principalmente, pesquisas realizadas em casa de vegetação e campo, no Brasil.

2.1. Biocontrole de doenças do trigo e milho

Em experimento de campo, no ano de 1990, nove microrganismos, incluindo bactérias e leveduras foram avaliados como tratamento biológico de sementes. Todos os antagonistas reduziram o mal-do-pé do trigo (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) avaliado pela percentagem de espigas brancas e sintomas nas raízes comparado a plantas não tratadas. *Bacillus subtilis* apresentou controle da doença significativamente maior que os outros antagonistas com 98 % de proteção (Luz, 1993a). Outros experimentos em 1988 and 1989 demonstraram que a microbiolização das sementes protegeu significativamente contra os principais fungos transmitidos pelas sementes (*Bipolaris sorokiniana*, *Stagonospora nodorum* e *Drechslera tritici-repentis*). Certos tratamentos foram semelhantes ao controle químico com thiran + iprodione (50 + 150g/100 Kg de sementes) (Luz, 1994). A giberela do trigo (*Giberella zeae* - *Fusarium graminearum*) foi reduzida no campo por *B. subtilis* (64/88.2 e 178/86.1), *Bacillus* sp. (66/86.2) e a levedura *Sporobolomyces roseus* (58/88.2) na faixa de 67 a 87 % (Perondi *et al.*, 1996). Já Luz (1996) relatou *P. putida* (63/88.4B) controlando a podridão da raiz do trigo no campo.

BPCP podem ser utilizadas no manejo integrado juntamente com fungicidas. Luz (2003a) verificou que o tratamento de sementes de trigo com diferentes combinações de *Paenibacillus macerans* e difenoconazole, reduziram significativamente a incidência de *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis* e *Aspergillus* spp. nas sementes. Em campo todos os tratamentos promoveram aumentos significativos na germinação e no rendimento de grãos, com exceção do difenoconazole, que isoladamente, aumentou apenas o rendimento. Os efeitos na germinação foram maiores quando houve integração do controle biológico com o químico, mesmo quando as doses foram reduzidas a metade, portanto, o uso das misturas pode promover uma diminuição substancial do uso de pesticidas na cultura do trigo. Resultados similares foram obtidos por Luz (2003b) no tratamento de sementes de milho com o mesmo bioprotetor *P. macerans* e fungicidas fludioxonil + metalaxyl M.

2.2. Biocontrole do tombamento ou damping-off causado por *Rhizoctonia solani*

Um total de 112 isolados bacterianos incluindo *Pseudomonas* spp. fluorescentes (67) e *Bacillus* spp. (45) foram testados contra *Rhizoctonia solani* (grupo de anastomose 4) através de tratamento de sementes de feijão em condições de casa de vegetação e campo. Na casa de vgetação *B. subtilis* (AP323, AP3, AP183) e três *Pseudomonas* fluorescentes (FR38, CR26, TR48) protegeram mais efetivamente plântulas de feijão contra o tombamento causado por *R. solani*. Quando isolados de *B. subtilis* foram testados contra diferentes níveis de inóculo e diferentes isolados de *R. solani*, AP183 mostrou maior eficiência que o tratamento químico com quintozene. Por outro lado os três isolados de *Pseudomonas* fluorescentes apresentaram menor eficiência que o quintozene em ambos experimentos (Andrade *et al.*, 1994). No campo, AP183 confirmou sua alta performance, atingindo uma média de 49 % de redução da severidade da doença (RSD) (Andrade *et al.*, 1994), e FR-38 também mostrou maior eficiência (>35 % RSD) do que quintozene (Gomes *et al.*, 1996).

O efeito do tratamento de sementes de caupi com *B. subtilis* (40 isolates) e *Pseudomonas* spp. fluorescentes (50 isolados) foi também avaliado para controle de *R. solani*. Depois da primeira seleção, os melhores antagonistas foram testados contra diferentes isolados e concentrações do patógeno. Os isolados AP-183 (*B. subtilis*) e CR-20 (*P. fluorescens*) os quais demonstraram maior eficiência em ambas as situações foram testados no campo onde significativamente reduziram a intensidade da doença (AP183>45 % e CR-20>30 % RDS)

e foram superiores ao quintozene (2.250 ppm) (Noronha *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 1995).

Sementes de algodão foram tratadas com 40 isolados bacterianos e 67 *Pseudomonas* spp. fluorescentes também para controle *R. solani*. Os melhores antagonistas foram testados contra diferentes isolados e concentrações do patógeno. O isolado BA-20 (*B. subtilis*) foi o mais eficiente em todas as situações, exceto quando comparado ao quintozene em condições controladas. Quando testado em campo com diferentes níveis de inóculo do patógeno BA-20 não reduziu significativamente a intensidade da doença, o que foi obtido pelo uso do Quintozene nos dois primeiros níveis de inóculo (Silva *et al.*, 1996). Houve grande variação na performance dos isolados de *Pseudomonas* spp. Para o controle de *R. solani* em todos os experimentos. No entanto, eles apresentaram maior eficiência que o quintozene em todos os ensaios em condições controladas (Andrade *et al.*, 1996).

2.3. Biocontrole da podridão-negra das crucíferas

Assis *et al.* (1995) estudaram o potencial de rizobactérias para o controle da podridão-negra das crucíferas e antracnose do rabanete causadas, respectivamente por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) e *Colletotrichum gloeosporioides*, em condições de campo. Os isolados SDR2 (*P. fluorescens*) e BS (*B. subtilis*) reduziram a severidade da doença em, respectivamente, 48,1 % e 42,0 %, comparadas com 44,8 % de controle obtido pelo antibiótico kasugamicina. Reduções da severidade da antracnose do rabanete foram ainda maiores, tendo JA2 (*P. fluorescens*) apresentado 60,4 % e BS 51,6 %. Este último valor foi similar ao controle com o fungicida benomil. Quarenta bactérias epifíticas e endofíticas foram também testadas contra *Xcc* em couve (Assis *et al.*, 1996a). O isolado R14 (*B. subtilis*), originalmente epifítico em repolho, induziu 100 % de controle da doença quando avaliado contra três isolados de *Xcc* e em três períodos de aplicação diferentes (72 h antes, simultaneamente e 72 h após inoculação do patógeno). No campo, este antagonista sobreviveu epifiticamente em folhas de couve até 45 dias, quando apresentou média de população de 15×10^4 UFC/mm² e nível de redistribuição de 6.6×10^4 UFC/mm² (Assis *et al.*, 1996b). Os mesmos autores avaliaram 20 isolados de *Bacillus* spp. contra *Xcc* no campo em plantas de repolho 'Mídiri' (Assis *et al.*, 1997). Os isolados C210 (*B. cereus*), C116 (*B. megaterium*), R14 (*B. subtilis*) e C240 (*B. cereus*) promoveram, respectivamente 78, 74, 73 e 71 % de RSD. Quando testados em diferentes períodos de aplicação em relação à inoculação com o patógeno, os melhores resultados foram obtidos por R14 (72 %) aplicado 4 dias antes + simultaneamente + 4 dias depois e por C116 (70 %) aplicado 4 dias antes + simultaneamente. Não houve diferença significativa de controle quando diferentes cultivares de repolho foram testados (Assis *et al.*, 1997).

De acordo com Luna *et al.* (2002) entre nove isolados epifíticos de *Bacillus*, apenas *B. subtilis* R14, *B. pumilus* C116, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. cereus* C210 apresentaram antibiose contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LFR-3. Em bioreator, o crescimento rápido de *B. subtilis* R14 foi obtido em meio contendo melão e extrato de levedura como fontes de C e N, respectivamente. Durante a fase exponencial a taxa de crescimento específico foi de 1.2 h⁻¹. Rápida esporulação foi observada no meio balanceado para C/N. Após a fase de esporulação obteve-se o máximo de concentração de esporos viáveis, cerca de 10⁹ UFC/mL. Melhor separação de biomassa foi obtida em pH baixo.

Segundo Monteiro (2003), o antagonismo de oito isolados de *Bacillus* contra nove isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foi avaliado para acessar o papel dos lipopeptídeos neste processo. Testes de atividade antimicrobiana e hemolítica (surfactante) foram realizados *in vitro* usando o método de difusão em ágar. Antibiose e hemólise foram positivas para quatro isolados de

Bacillus. A correlação observada entre essas atividades indicou que os lipopeptídeos estão envolvidos no mecanismo de antibiose dos antagonistas. Estudos de fermentação com os isolados que apresentaram atividades antimicrobianas e hemolíticas mais acentuadas foram realizados para acompanhar o crescimento e produção de compostos bioativos e surfactantes, observada durante o final da fase de crescimento.

2.4. Biocontrole da Murcha-bacteriana

Actinomicetos foram testados contra isolados de *Ralstonia solanacearum*, “in vitro” (Moura & Romeiro, 1999), sob condições controladas (Moura *et al.*, 1998) e no campo (Moura, 1996). O melhor método para aplicação do tratamento foi a imersão de sementes. O controle da doença variou de 50 a 100 % dependendo do antagonista e local do experimento (casa de vegetação, micro parcelas, campo). A autora explicou a variação de controle pelas diferenças na população do patógeno, condições ambientais e microflora (Moura, 1996).

2.5. Biocontrole em pós-colheita

A podridão mole do pimentão foi reduzida em mais 85 % por *P. marginalis* (P-5) aplicada simultaneamente ou 2 h antes do patógeno, mas o cálcio reduziu o efeito antagonístico para 73,3 % . Não foi detectada antibiose “in vitro” (Melo *et al.*, 1995).

A podridão de frutos de maçã (*Penicillium expansum*, resistente a benomil) foi reduzida por *B. subtilis* em condições de laboratório (22°C) e câmara fria (0-1°C) avaliando-se o diâmetro da lesão. A redução do número de lesões por fruto, o fator mais importante pois impede a comercialização, foi obtida a 22°C mas não em câmara fria (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1992).

A podridão radicular (*Roselinia necatrix*) foi controlada em 100% nas mudas de macieiras tratadas por imersão de raízes com as suspensões dos antagonistas 10.2 CLBB e 8.3, em telado e estufins mantidos em condições de campo. Na comparação de isolados com ou sem aditivos, o maior controle da doença foi obtido pelo tratamento de raízes das mudas com o isolado 10.2 CLBB (*Pantoea agglomerans*) aplicado conjuntamente com 0,1% de carboxi-metil-celulose (Valdebenito-Sanhueza, 2001)

2.6. Promoção de crescimento

Luz (1993a) relatou aumento de 105 % na produção de trigo no campo, em 1990 causado por *B. subtilis*. Experimentos realizados em 1988 e 1989 testando oito microrganismos evidenciaram *B. subtilis* e os isolados bacterianos 155/86.4 e 4/88.4AA como os melhores para aumentar a emergência de plântulas no campo. O isolado 4/88.4AA foi o melhor para aumentar a produção de grãos no campo (Luz, 1994). Em condições de campo, o tratamento das sementes com *B. subtilis* (64/88.2 e 178/86.1), *Bacillus* sp. (66/86.2) e a levedura *Sporobolomyces roseus* (58/88.2) aumentou a produção de 18 a 31 % (Perondi *et al.*, 1996). Luz (1996) relatou aumentos significativos no crescimento de plântulas tratadas com *P. putida* biótipo B (63/88.4B), e isolados bacterianos 21/91.11.2A e 47/91.5.2C. No campo, *P. putida* biótipo B aumentou significativamente (9,4 %) a produção de trigo considerando a média de experimentos de quatro anos, sendo maior do que o aumento obtido usando iprodione + thiran (6,5 %).

Stein (1988) relatou que *Pseudomonas fluorescens*, utilizada em tratamento de sementes,

promoveu aumentos de germinação e peso fresco de até 60,3 e 78 %, respectivamente em plântulas de tomateiro. Já Mantovanello & Mello (1994) utilizando rizobactérias do gênero *Pseudomonas* obtiveram aumentos no peso seco da parte aérea (até 44 %) e raízes (36,8 %) de plântulas de tomateiro, em solo não autoclavado. Em solo autoclavado, os aumentos foram respectivamente de até 138,5 e 119 %. Peixoto *et al.* (1995) assinalaram também a promoção de crescimento de plântulas de tomateiro por isolados de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas a *R. solanacearum* (biovar III). FR48, TR33 e FR44 induziram os maiores aumentos de emergência com valores médios de respectivamente, 52,5, 45,7 e 40,5 %. FR4 promoveu os maiores aumentos de altura e peso seco com valores médios de 30,9 % e 61,1 %, respectivamente. O tratamento do substrato associado à bacterização da semente demonstrou ser, em geral, o método mais eficiente. O tratamento de sementes de tomateiro com bactérias isoladas do rizoplane promoveu o crescimento de plântulas avaliado pelo número de folhas e altura de plântulas (Bentes *et al.*, 1998).

De acordo com Silveira *et al.* (1995), *Pseudomonas* spp. fluorescentes aplicadas a plântulas de feijão juntamente com micorrizas e *Rhizobium tropici* promoveram aumentos de peso seco de caules e nódulos, conteúdo de fósforo e nitrogênio, bem como maior colonização por micorrizas. Frequentemente, o melhor crescimento da planta e absorção de nutrientes foram observados pela inoculação em conjunto com *Glomus etunicatum*.

Assis *et al.* (1995) relataram que *Pseudomonas* fluorescentes e *B. subtilis* não aumentaram a germinação de rabanete ou peso seco de plântulas e que *P. marginalis* causou redução de germinação. No entanto, a altura foi elevada significativamente por quatro isolados de *P. fluorescens*.

Os isolados Ps-2 e Ps-3 de *Pseudomonas* sp fluorescentes induziram os maiores pesos secos e o Ps-2 aumentou o número de bactérias fluorescentes na rizosfera, quando plantas de café foram inoculadas e avaliadas após seis meses. Não houve diferenças significativas na altura das plantas e conteúdo de Fe, Mn, Cu e Zn (Freitas, 1989).

Quando *P. fluorescens* (BR5) foi inoculada em sementes de milho nenhum impacto foi observado nas populações residentes de bactérias dos grupos *Pseudomonas*, heterotróficas, celulolíticas e nitrificantes bem como na atividade de desidrogenase durante 90 dias. O peso seco foliar foi aumentado aos 60 e 90 dias após o plantio. Microscopia eletrônica e ótica mostraram a colonização bacteriana de pelos radiculares e epiderme (Botelho *et al.*, 1995).

Campello (1992) relatou que *P. fluorescens*, *P. marginalis* e *B. subtilis* aumentaram a germinação do eucalipto e promoveram o peso seco e a altura das plântulas. Estes efeitos foram mais evidentes em solo esterilizado e quando as sementes foram tratadas, comparando-se com a bacterização do solo.

Cattelan (1993) bacterizou sementes de soja com suspensões de *Pseudomonas* spp. ou sobrenadantes destas suspensões e observou que o último tratamento aumentou o comprimento de raízes das plântulas até 76 %, o que foi atribuído a produção de substâncias de crescimento no meio de cultura.

Freitas & Pizzinatto (1991) relataram que *Pseudomonas* sp. fluorescente, isolado Ps-4A, induziu aumento de peso seco em tomate, o que foi justificado pelo antagonismo da bactéria a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raça 1.

Visando a promoção de crescimento de plantas de helicônia, Assis (2002) testou 50 bactérias isoladas de folhas e sementes de plantas de helicônia sadias em casa de vegetação. Para a seleção preliminar, antes do plantio foram depositados 100 mL da suspensão bacteriana ($A_{580} = 0,7$) por vaso. Após quatro meses as mudas foram avaliadas quanto ao diâmetro do pseudocaule (DPC), matéria seca da parte superior - folhas e pseudocaule (MSS), matéria

seca da parte inferior – rizoma e raiz (MSI) e altura do pseudocaulo (AP). Os três isolados mais eficientes HPS6, HPF14 e HNF15 foram identificados como *B. pumilus*, *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii* e *Bacillus cereus*, respectivamente, testados quanto à compatibilidade e utilizados em misturas. A mistura dos isolados compatíveis HPS6 e HNF15 promoveu aumentos significativos ($P=0,05$) de DPC (71,4%), MSS (131,0%), MSI (84,0%), AP (74,1%) e AF (83,3%). Não foi observada a produção do ácido indol acético, ácido cianídrico ou solubilização de fosfatos. O fósforo foi o único macronutriente cujo teor aumentou (62,3%) significativamente ($P=0,05$) entre as mudas cultivadas em substrato tratado. Os mutantes resistentes a rifampicina e ácido nalidíxico obtidos apresentaram colonização epifítica e endofítica em raízes de helicônia onde sobreviveram até 120 dias (Figura 1).

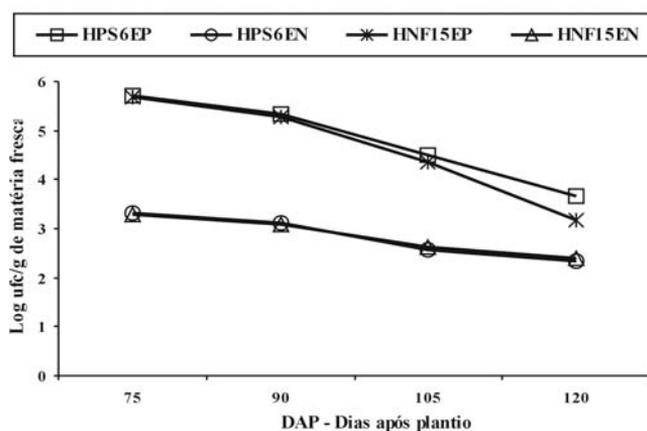


Figura 1. — Colonização epifítica (EP), endofítica (EN) e sobrevivência de mutantes de *Bacillus pumilus* (HPS6^{Rif-Nal}) e *B. cereus* (HNF15^{Rif-Nal}), em raízes de *Heliconia psittacorum*, 75, 90, 105 e 120 dias após o plantio de rizomas em substrato bacterizado.

Gomes *et al.* (2003) avaliou isolados bacterianos epifíticos e endofíticos, obtidos de plantas sadias de alface, para promoção de crescimento de mudas e plantas, respectivamente em estufa e campo de cultivo orgânico (Chã Grande - PE). Nos experimentos em estufa, foi utilizada a cultivar Verônica e em campo, as cultivares Verdinha e Verônica. Os isolados foram aplicados por bacterização simultânea nas sementes e substrato. Em campo, foram utilizados os isolados mais eficientes, C25 (*Bacillus thuringiensis* subvar. *kenyae*) e C116 (*Bacillus pumilus*), separadamente e em mistura, após teste de compatibilidade. Em estufa, foram avaliadas a matéria fresca de raízes (MFR), da parte aérea (MFPA) e total (MFT), 21 dias após a bacterização. Em campo, foi determinado o peso da matéria fresca total de plantas comercializáveis 21 e 28 dias após o transplante, respectivamente para as cultivares Verdinha e Verônica. Os mecanismos de ação de BPCP analisados foram produção de ácido indol acético, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e alterações dos teores foliares dos macronutrientes, N, P, K, Ca e Mg. Em estufa, as mudas apresentaram aumento significativo em relação à testemunha para MFR, MFPA e MFT quando foi utilizado o isolado C116 e para MFR e MFT utilizando-se o C25. No campo, não houve promoção significativa no crescimento nas plantas das cultivares Verdinha e Verônica, tratadas com C25 e C116 separadamente ou em mistura. Dos mecanismos de ação analisados verificou-se apenas elevação significativa ($P=0,05$) do teor foliar de N pelo isolado C25.

Silveira et al. (2004) isolou bactérias epifíticas e endofíticas de plantas de pepino sadias, coletadas em diversos municípios do Estado de Pernambuco e avaliadas na promoção de crescimento de plântulas em casa de vegetação. Foram realizados três bioensaios. No primeiro foram testados 93 isolados; no segundo, 32 isolados e; no terceiro, oito isolados de pepino e mais 10 isolados provenientes de outras culturas. As sementes de pepino foram bacterizadas, semeadas em substrato orgânico contido em bandejas de isopor e analisadas dez dias após a semeadura quanto às matérias secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST). Dos três bioensaios os isolados epifíticos PEP52, PEP8, PEP82, PEP91 e C22 foram selecionados por aumentarem significativamente a MSR e MST das plântulas. Após o teste de compatibilidade “in vitro”, esses cinco isolados, testados separadamente e em misturas, mostraram-se eficientes no aumento do índice de MSPA, MSR e MST das plântulas de pepino, sem diferirem significativamente entre si. Os isolados PEP81 (*Bacillus amyloliquefaciens*) e PEP91 (*Enterobacter cloacae*) destacaram-se com índices de aumentos de 55,5 e 39,5% (MSPA), 42,9 e 37,2% (MSR) e 41,6 e 34,0% (MST), respectivamente. A produção do ácido indol acético, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e alteração nos teores foliares dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg, foram avaliados como possíveis mecanismos de ação desses dois isolados, porém com resultados negativos. A bacterização das sementes com *B. amyloliquefaciens* PEP81 e *E. cloacae* PEP91 pode melhorar a qualidade das mudas de pepino (Silveira et al., 2004).

3. UTILIZAÇÃO DE BPCP NA MICROPROPAGAÇÃO “IN-VITRO”

Apesar de bem estabelecidas como produtos biológicos para controle biológico de doenças e pragas, o uso de BPCP na produção de mudas micropropagadas ainda está em fase inicial. Os efeitos benéficos das BPCP sobre mudas micropropagadas são principalmente, aumento de área foliar, diâmetro de pseudocaule, número de folhas e matéria seca, com conseqüente redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante. No campo, observa-se proteção contra doenças e aumento de produtividade.

No congresso Internacional de BPCP realizado em 1987 no Canadá, Jerzy Nowak descreveu a utilização de uma bactéria na micropropagação de plantas. Enquanto a maioria dos pesquisadores tentava eliminar inicial após o transplante. Em experimentos de campo (média de experimentos de 1987 a 1993 em várias localidades), evidenciou-se que a sobrevivência das plantas após o transplante direto sem aclimatização foi bacterizadas contaminantes de culturas de tecidos, Nowak adicionou a estas culturas o isolado PsJN de *Pseudomonas* sp. não fluorescente, obtido como endofítico de raízes esterilizadas de cebola, o qual promoveu significativo crescimento das plantas (Herman, 1987).

O isolado PsJN estimulou o crescimento in vitro de explantes nodais de batata bacterizados com $2,8 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por 5 a 10 segundos e cultivados em Meio MS sem hormônios. Houve aumento significativo no número de raízes (24-196%), peso da matéria seca de raízes (44-201%), peso da matéria seca total (14-151%), comprimento do caule (26-28%), formação de pelos foliares (55-110%), ramificação secundária de raízes e conteúdo total de lignina (43%) em relação à testemunha (Frommel et al., 1991). O funcionamento dos estômatos foi melhorado assemelhando-se aos de plantas aclimatadas em casa de vegetação. Assim, folhas retiradas de plantas bacterizadas apresentaram após 5 minutos 90,1% de fechamento de estômatos enquanto apenas 8,3% ocorreu em plantas não bacterizadas. Plantas aclimatadas apresentaram valores de 89,3 e 88,7%, respectivamente (Frommel et al., 1991). A bacterização

também melhorou o estabelecimento em casa de vegetação e/ou crescimento significativamente melhor (77,6%) que na testemunha (61,7%) e similar àquela de plantas aclimatadas previamente em casa de vegetação (Frommel *et al.*, 1991; Nowak *et al.* 1995; Lazarovits & Nowak, 1997; Nowak *et al.*, 1999). Observou-se que os benefícios da bacterização foram maiores nos anos em que baixa precipitação seguiu o transplântio mas não em anos com seca severa ou chuvas pesadas. No campo, em geral, a produtividade foi maior para plantas bacterizadas em relação às não bacterizadas, embora tenha sido inferior a plantas aclimatadas (Nowak *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm demonstrado o efeito das BPCP como agentes de proteção biológica contra patógenos sendo evidenciada redução de até 100% na severidade de algumas doenças. O controle biológico de doenças tem sido observado em plantas bacterizadas com PsJN, que foram mais resistentes a baixos níveis de *Verticilium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani* em relação ao controle (Nowak *et al.*, 1998). A cv. Kennebec, mais suscetível à doença, se beneficiou mais da bacterização que a cv. Desirée menos suscetível. A bactéria não inibiu estes fungos *in vitro* evidenciando uma possível indução de resistência explicada pelo aumento de lignina, maior atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) e maior teor de ácidos fenólicos como cafeico e clorogênico (Nowak *et al.*, 1998).

O isolado PsJN protegeu plantas de videira provenientes de explantes nodais (1 cm) em meio MS contra *Botrytis cinerea*. Os autores sugerem indução de resistência apesar de em cultivo pareado o patógeno ter sido inibido e as hifas apresentarem vesículas e esvaziamento celular. As plantas apresentaram crescimento mais rápido, maior número de raízes secundárias, pelos foliares e radiculares, principalmente na segunda geração. No entanto, o peso da matéria seca das raízes e parte aérea foram os melhores indicadores de crescimento (Barka *et al.*, 2000). Barka *et al.* (2002) confirmaram a antibiose de PsJN contra *B. cinerea* quando o antagonista foi cultivado 48 antes do patógeno, causando disrupção da parede celular e morte. Apesar de não haver efeito sobre a atividade de poligalacturonase do patógeno, plântulas bacterizadas não apresentaram sintomas quando inoculadas com *B. cinerea*.

Esta bactéria tem sido até agora a mais eficiente promotora de crescimento já encontrada (Conn *et al.*, 1997; Nowak *et al.*, 1999). O desafio é melhorar a competitividade de PsJN pois a diversidade de endofíticas em tubérculos sementes é enorme. Misturas com organismos bons colonizadores do sistema vascular podem melhorar a estabilidade do inoculante na planta e garantir a predicibilidade de respostas de clones de batata a estresses ambientais (Nowak *et al.*, 1998).

Com relação às bactérias diazotróficas, no Brasil, a aplicação da bactéria *Asaia bogorenses* a mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Cayenne Champac durante a fase de aclimatização, reduziu a mortalidade das plantas, observando-se uma taxa média de sobrevivência de 98,8% e maior acúmulo de matéria seca de raízes no substrato composto por casca de arroz carbonizada, vermiculita e vermicomposto. Observou-se também uma redução no tempo de aclimatização de 6 a 8 meses para 120 dias (Weber *et al.*, 2003). Esses mesmos autores relataram que bananeiras micropropagadas das cvs. Prata Anã e Caipira, cultivadas *in vitro*, em substrato pobre em nitrogênio apresentaram maior crescimento na presença de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, respectivamente. No entanto, em casa de vegetação, a cv. Caipira cultivada em substrato suplementado com Hoagland (5 mg nitrogênio L⁻¹) desenvolveu-se melhor na presença dos dois gêneros em comparação com a bacterização isolada e teve crescimento equivalente ao controle com Hoagland (50 mg nitrogênio L⁻¹), embora o acúmulo de nitrogênio na parte aérea tenha sido menor (Weber *et al.*, 2000).

Vários trabalhos têm relatado resultados da inoculação de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas com *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* (Pereira & Baldani, 1997; Silva *et al.*, 1998). Um protocolo foi criado por Reis *et al.* (1999) recomendando a inoculação de *A. diazotrophicus* no fim do período de enraizamento em meio sem hormônios e vitaminas, com concentração de açúcares e minerais reduzida em 10 vezes. Este processo favorece o estabelecimento da bactéria que coloniza o tecido e se acumula nos espaços intercelulares, na região de emergência de raízes laterais e no sistema vascular, permitindo isolamento após 30 dias de aclimatização.

No laboratório de Fitobacteriologia e casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tem sido estudada a redução da fase de aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxi e banana bem como o controle de doenças nessas duas hospedeiras pela utilização de BPCP.

Mello *et al.* (2002) avaliaram a eficiência de 19 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi cv. Pérola utilizando diferentes métodos de bacterização. As variáveis altura da planta, número de folhas, área foliar, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca do sistema radicular foram avaliadas trinta dias após o transplantio. Dentre os métodos testados, a imersão do sistema radicular e a infestação do substrato + imersão do sistema radicular foram os mais eficientes, sendo escolhido o método da imersão do sistema radicular, pela maior praticidade. Dentre os isolados testados, os mais eficientes foram C210, ENF16, RAB9 e ENF10. Aumentos de 163,6%, 107,7% e 87,0% foram obtidos pelo isolado RAB9 aplicado pela imersão do sistema radicular, respectivamente para as variáveis peso da matéria seca da parte aérea, peso da matéria seca do sistema radicular e área foliar. Todos os isolados selecionados foram compatíveis e as misturas entre os isolados ENF10 + RAB9, ENF16 + C210 e C210 + RAB9 induziram aumentos de 100,3%, 88,1% e 80,1%, respectivamente para a variável peso da matéria seca do sistema radicular (Tabela 1). Não foi observada a produção de AIA, HCN ou solubilização de fosfatos, nas condições experimentais utilizadas. O nitrogênio foi o único macronutriente cujo teor diferiu significativamente entre as mudas bacterizadas e testemunhas. Este trabalho demonstrou que misturas dos isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10, aplicadas pela imersão do sistema radicular, promoveram o aumento de biomassa de mudas de abacaxizeiro micropropagadas, reduzindo a fase de aclimatização.

Tabela 2. — Promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola micropropagadas, utilizando-se o método de imersão do sistema radicular em suspensões bacterianas separadamente e em misturas.

Tratamento	MSA ¹ (g)	MSR(g)	AF(cm ²)
C210 (<i>Bacillus cereus</i>)	193,7 ^{bc}	53,7ab	9,0b
ENF16 (<i>B. pumilus</i>)	212,5abc	51,2ab	12,3ab
RAB9 (<i>Bacillus</i> sp.)	167,5bc	38,7ab	8,2b
ENF10 (<i>B. thuringiensis</i> subvar. <i>kurstaki</i>)	191,2bc	46,2ab	11,4ab
ENF10+ RAB9	187,5bc	62,5a	9,0b
ENF16+C210	180,0bc	58,7a	13,0ab
C210+RAB9	192,5bc	56,2a	8,7b
ENF16+RAB9	216,2ab	53,7ab	9,0b
ENF10+C210	226,2ab	53,7ab	17,9a
C210+RAB9+ENF10+ENF16	268,7a	53,7ab	14,7ab
ENF10+ENF16	223,7ab	50,0ab	11,1ab
Testemunha	153,7c	31,2b	9,8b

¹MSA = peso da matéria seca da parte aérea, MSR = peso da matéria seca do sistema radicular, AF = área foliar;

²Média de oito repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Mello *et al.* (2001) bacterizaram mudas de abacaxi cv. Pérola micropropagadas, não aclimatadas, com 19 isolados endofíticos e epifíticos através de imersão de raízes ou pulverização de folhas destacadas e não destacadas. O patógeno foi inoculado após quatro dias através de ferimentos nas raízes e deposição de 40 ml de inóculo (10^6 conídios ml^{-1}) ou ferimentos com pulverização do inóculo na base das folhas, para os métodos de imersão de raízes e pulverização das folhas, respectivamente. Após 60 dias, foram avaliados o número de folhas infectadas e a severidade da doença com base nos sintomas internos e nas lesões foliares de escala de notas. Foram ainda calculados os índices de doença para sintomas internos e lesões foliares, e a redução da severidade da doença em relação à testemunha. A produção de HCN, celulase, pectinase, antibiose e competição por ferro foram analisadas como mecanismos de biocontrole. No primeiro experimento, utilizando a imersão de raízes, os isolados ENF12 (não identificado), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*Enterobacter cloacae*), C210 (*B. cereus*) e IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*) diferiram significativamente da testemunha com relação às notas atribuídas para cada planta, embora não diferissem do controle com benomil. ENF12, C21 e benomil reduziram a severidade da doença em 85,2; 79,1 e 88,0% respectivamente, em relação a testemunha. No segundo experimento, utilizando a pulverização de folhas destacadas com os biocontroladores, EN5 (*Alcaligenes piechaudii*) diferiu significativamente da testemunha quanto ao índice de doença com uma RSD de 90,2%. No terceiro experimento (Tabela 3), utilizando a pulverização dos biocontroladores em plantas, apenas ENF14 diferiu significativamente da testemunha para todos os índices, reduzindo a severidade da doença em 55,6; 39,4 e 68,4 considerando, respectivamente, índice de doença para lesões foliares, número de folhas infectadas e índice de doença para sintomas internos. Nenhum isolado produziu celulase, pectinase ou HCN. No entanto, C210, R14, ENF19, ENF14, C11 e C21 inibiram o crescimento do patógeno “in vitro” por antibiose. Na competição por ferro foi demonstrado que os isolados C210 e C11 apresentaram reversão da inibição do crescimento micelial do patógeno apenas no nível de 50 ppm de FeCl_3 enquanto que EN5 apresentou reversão já no nível de 20 ppm. Os outros isolados não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de ferro, embora todos tenham diferido da testemunha em todos os níveis. Os resultados apontam o isolado *E. cloacae* ENF14 como potencial biocontrolador para a fusariose do abacaxizeiro. No entanto, recomendam-se testes com misturas dos isolados ENF14, EN5, C210 e C21 que agem por mecanismos distintos, utilizando-se a bacterização por pulverização das folhas.

Tabela 3. — Efeito de bactérias aplicadas por pulverização da base de folhas de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola sobre a fusariose causada por *Fusarium subglutinans* em casa de vegetação.

Tratamento	IDF ²	RSD ³ (%)	NFI	RSD (%)	IDI	RSD (%)
ENF19 (N.I.)	50,2a ⁴	-	4,1a	-	43,7a	-
C11 (<i>Bacillus</i> sp.)	47,6a	-	3,8a	-	32,5ab	-
R14 (<i>B. subtilis</i>)	41,2ab	-	3,8ab	-	32,5ab	-
EN5 (<i>Alcaligenes piechaudii</i>)	39,3ab	-	3,6abc	-	25,0bc	-
Testemunha	38,0ab	-	3,3abc	-	23,7bc	-
C21 (<i>Bacillus</i> sp.)	37,9ab	0,2	3,4abc	-	32,5ab	-
RAB9 (<i>Bacillus</i> sp.)	34,0abc	10,4	3,2abc	3,0	27,5bc	-
Benomil	33,6abc	11,5	2,8bcd	15,1	21,2bc	10,5
C210 (<i>B. cereus</i>)	29,1bc	23,5	2,6cd	19,7	18,7cd	21,0
ENF14 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	16,9c	55,6	2,0d	39,4	7,5d	68,4

¹N.I. = não identificado;

²IDF = índice de doença calculado com base em escala de notas para lesões foliares, NFI = número de folhas

infectadas, IDI = índice de doença calculado com base em escala de notas para sintomas internos;

³RSD (%) - Redução da severidade da doença calculada pela fórmula de EDINGTON *et al.* (9);

⁴Médias de quatro repetições com 5 plantas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Albuquerque *et al.* (2003) avaliaram o efeito de BPCP na promoção de crescimento e no biocontrole da murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (Foc) em mudas micropropagadas de bananeira. As BPCP foram aplicadas por imersão de raízes + infestação do solo. A promoção de crescimento foi avaliada pelas variáveis: diâmetro do pseudocaule (PC), número de folhas (NF), peso da matéria seca da parte subterrânea (MSS), peso da matéria seca da parte aérea (MSA), taxa de crescimento (TC) e área foliar (AF).

No primeiro experimento avaliado trinta dias após a bacterização, os isolados E2, RAB9, ENF24 e C210 aumentaram significativamente ($P=0,05$) o DP, NF e MSS. No entanto, sessenta dias após a bacterização, apenas o isolado RAB9 continuou aumentando os valores de MSS (52%). As misturas testadas 1 (E2+RAB9+C210+ ENF24), 2 (E2+RAB9 +C210) e 3 (E2+RAB9+ ENF24) elevaram significativamente a AF, MSA. Apenas a mistura 1 elevou significativamente o NF em 41,7% enquanto as misturas 1 e 3 aumentaram significativamente MSR respectivamente em 52,4 e 47,4%. Para o biocontrole o Foc foi inoculado 5 dias após a bacterização com RAB9, E2 e ENF24.

Na avaliação, além da variável peso da matéria seca (MS), foram determinados a severidade da doença (SE) no experimento avaliado aos sessenta dias e o índice de doença (IDO) no experimento avaliado aos trinta dias. A SE foi avaliada com base nos sintomas internos do pseudocaule, de acordo com escala de notas. Todos os isolados significativamente promoveram o crescimento e exerceram o biocontrole (Tabela 4). RAB9 elevou a matéria seca total em 995,6% e reduziu a severidade da doença em 100% aos 60 dias após a inoculação. Não foi detectada solubilização de fosfatos, produção de HCN ou antibiose contra o patógeno.

Tabela 4. — Efeito de isolados de bactérias promotoras de crescimento de plantas no controle biológico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, avaliado com 60 dias (Experimento 1) e 30 dias após a inoculação (Experimento 2).

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	MST ¹ (mg)	SE	MST ¹ (mg)	ID
RAB9 (<i>Bacillus</i> sp.)	2,52 a	0,00 b	190,00 a	20,00 b
E2 (N.I.)	2,32 a	0,50 b	217,50 a	15,00 b
ENF24 (<i>B. pumilus</i>)	2,27 a	0,75 b	192,50 a	17,00 b
Testemunha	0,23 b	4,25 a	120,00 b	52,00 a

¹MST = matéria seca; SE = severidade; ID = índice de doença; N.I. = não identificado

²Médias com 4 repetições. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4. UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDÓFITICAS

4.1. Conceitos e importância

Bactérias endófitas (BE) são aquelas que podem ser isoladas de tecidos vegetais desinfestados ou extraídas do interior da planta e não causam prejuízo visível à mesma. Desde 1940 foram publicados vários relatos sobre BE nativas em sementes, óvulos, tubérculos, raízes, caules, folhas e frutos (Hallmann *et al.*, 1997). Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no estudo da ocorrência, do potencial de colonização e da utilização dessas bactérias para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas. As BE não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre no solo da rizosfera e têm maior eficiência uma vez que, ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente no sistema radicular, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas. A associação BE-planta consiste numa interação íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria irá

promover o crescimento e sanidade da planta.

4.2. Promoção de crescimento por BE

Na maioria dos gêneros de BE, a produção de auxinas, etileno e citocininas, o aumento da absorção de água e nutrientes bem como a supressão de microrganismos deletérios são responsáveis pelo crescimento da planta. Este efeito benéfico tem sido verificado em plantas micropropagadas, conforme já discutido.

BE têm sido associadas à promoção de crescimento de diversas espécies entre as quais tomate, alface, batata, milho, pepino, arroz e algodão (Hallmann *et al.*, 1997; Hallmann, 2001). No entanto, uma dificuldade encontrada no levantamento destes trabalhos foi a ausência de comprovação da colonização endofítica dos tecidos após a introdução dessas bactérias no sistema solo-hospedeiro. Na tabela 5 observam-se exemplos de aumentos de biomassa induzidos por bactérias endofíticas em algumas culturas.

Nos ecossistemas florestais, BE podem aumentar efetivamente a plasticidade fenotípica de árvores de longa vida sob condições desfavoráveis tais como períodos de seca, redução de nutrientes ou ataque de patógenos. Segundo Chanway (1998) os isolados N1 actinomiceto e N4 *Bacillus* estimularam o crescimento de plântulas de abeto apenas em presença de solo de floresta contendo patógenos o que sugere que esses isolados tenham agido por biocontrole e possivelmente indução de resistência no hospedeiro. Já as bactérias endofíticas *B. polymyxa* Pw2-R e *P. fluorescens* Sm3-RN podem colonizar internamente tecidos de raízes e caules de pinheiro “lodgepole” e abeto híbrido promovendo crescimento. Além disso, Pw2 possui atividade de nitrogenase e coloniza plântulas de pinheiro sistemicamente, o que explica o crescimento do seu hospedeiro em condições de deficiência de N e ausência de fixação significativa de N rizosférico (Chanway, 2001).

4.3. Promoção de crescimento por diazotróficas endofíticas

A biofertilização é responsável por cerca de 65% do nitrogênio utilizado por plantas cultivadas no mundo. Leguminosas são geralmente utilizadas como adubação verde. Os organismos mais eficientes na fixação de Nitrogênio são as bactérias diazotróficas *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*,

Azorhizobium e *Allorhizobium*, sobre as quais muito se tem estudado. Essas bactérias formam uma simbiose específica com leguminosas hospedeiras. A simbiose é iniciada pela formação de nódulos nas raízes ou no caule em resposta à presença das bactérias. A secreção de moléculas sinais, os lipooligosacarídeos, têm papel crucial neste processo. As bactérias penetram no córtex multiplicam-se e se diferenciam em bacteróides, os quais produzem o complexo enzimático da nitrogenase. Dentro dos nódulos, a planta cria um ambiente com baixa concentração de nitrogênio, que permite a nitrogenase bacteriana converter o N atmosférico em amônia. Como contrapartida, as plantas fornecem às bactérias as fontes de carbono (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Tabela 5. — Exemplos de aumentos de biomassa induzidos por bactérias endofíticas em algumas culturas

Cultura-local experimento	Isolado endofítico	Aumento (%) ¹	Referência
Abeto-campo	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SM3-RN	Até 57,0 ABT	Chanway <i>et al.</i> , 2000
	<i>Bacillus polymyxa</i> Pw2-R		
Batata ‘Norchip’-“in vitro”	<i>Pseudomonas</i> sp. PsJN	600 a 1000 ABR	Lazarovitz & Nowak, 1997
Batata ‘Kennebec’-“in vitro”	<i>Pseudomonas</i> sp. PsJN	200 a 400 ABR	Lazarovitz & Nowak, 1997
Batata-campo	<i>Pseudomonas</i> sp. PsJN	72,4 ABT; 46,8 ANI	Frommel <i>et al.</i> , 1993
Helicônia—casa de vegetação	<i>Bacillus cereus</i> HNF15	77,0 ABA; 49,5 ABR; 210,4 AAF	Assis <i>et al.</i> , 2002
Tomateiro-casa de vegetação	Actinomiceto BF22	423,0 ABT; 171,4 AA	Moura & Romeiro, 2000

¹Aumentos (%) de biomassa da parte aérea (ABA), biomassa do sistema radicular (ABR), biomassa total (ABT), área foliar (AAF), número de tubérculos (ANI), altura de plantas (AA).

As rizobactérias diazotróficas não simbióticas tais como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter* também são capazes de fixar o N atmosférico. Elas usam um complexo de nitrogenase que funciona sob baixa concentração de oxigênio, sendo menos específico na sua interação com plantas do que no caso dos rizóbios (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). A maioria desses gêneros é encontrada endofiticamente em raízes, caules e folhas. O *Azospirillum* coloniza principalmente a rizosfera, podendo, entretanto manter uma população endofítica constante como observado para o isolado SP245 em trigo. Esse gênero, além de ser diazotrófico, secreta fitohormônios principalmente auxinas, e promove o aumento da absorção de nutrientes e água com conseqüente crescimento da planta (Schloter & Hartmann (1998).

Em algumas partes do Brasil, a cana-de-açúcar tem sido cultivada continuamente por mais de 100 anos sem adição de fertilizantes nitrogenados (Neyra & Döbereiner, 1977). Certas variedades de cana podem obter 50-80% do seu nitrogênio a partir da fixação biológica (Lima *et al.*, 1987). Cavalcante & Döbereiner (1988) descobriram uma bactéria endofítica em raízes e caules, Gram negativa, fixadora de N, posteriormente denominada *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989). Esta bactéria consegue tolerar altas concentrações de sacarose (10-30%) sendo insensível ao N mineral enquanto fixando N₂. Como ela não possui a enzima nitrato redutase, a nitrogenase é ativa mesmo na presença de 80 mM de NO₃⁻ (Li & MacRae, 1991). Além disso, a atividade da nitrogenase é apenas parcialmente inibida em presença de NH₄⁺ e aminoácidos, especialmente quando em presença de 10% de sacarose (Boddey *et al.*, 1991). Esta bactéria é endofítica obrigatória incapaz de persistir na ausência de sua hospedeira (Baldani *et al.*, 1997). No entanto, pode sobreviver na rizosfera da cana e infectar plantas pela extremidade das raízes jovens, onde o tecido vascular não está ainda diferenciado ou nos pontos de emergência de raízes laterais (James *et al.*, 1994). Este autor observou a bactéria dentro de células da epiderme aumentadas e intactas, 15 dias após a inoculação, de onde passou ao xilema com colonização sistêmica. Esta bactéria pode infectar outros hospedeiros ricos em açúcares como capim elefante var. Cameroon, batata-doce e café (Chanway, 1998). Já *Herbaspirillum* spp. coloniza endofiticamente a cana-de-açúcar com populações 10 vezes maiores que as de *A. diazotrophicus* (10⁴ a 10⁶ células g⁻¹ de matéria fresca). No entanto, não utiliza sacarose e possui nitrato redutase, significando que a fixação do N₂ é inibida pela presença de N₂ fixado (Chanway, 1998).

Tanto *A. diazotrophicus* como *Herbaspirillum* spp. permanecem endofiticamente, até mesmo em plântulas de cana-de-açúcar obtidas por cultivo de ápice caulinar e propágulos, não sendo

erradicadas pelo cultivo em meio contendo antibióticos tais como amoxicilina a 1000 ppm e cefatoxina sódica a 300 ppm (Donato *et al.*, 2001).

4.4. Biocontrole de doenças

No biocontrole de doenças, as BE podem atuar através de diversos mecanismos, entre os quais antibiose, competição e indução de resistência sistêmica. Na tabela 6 observam-se exemplos de biocontrole de doenças através de bactérias endofíticas.

Tabela 6. — Exemplos de biocontrole de doenças exercidos por bactérias endofíticas em diversas culturas

Patógeno/Vetor	Hospedeiro	Agente de biocontrole	Mecanismo de ação	Referência
CMV	pepino-campo	<i>Bacillus pumillus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. subtilis</i> <i>Kluyvera cryocrescens</i>	IRS	Yao <i>et al.</i> , 1997
<i>Erwinia tracheiphila</i> / <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> <i>Acalymma vittatum</i>	pepino	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Serratia marcescens</i>	IRS	Zehnder <i>et al.</i> , 1997a, 1997b
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomate	<i>P. fluorescens</i>	IRS/antígeno O da LPS	Duijff <i>et al.</i> , 1997
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomate	<i>B. pumillus</i>	IRS	Benhamou <i>et al.</i> , 1998
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	algodão	<i>Aureobacterium anophageum</i> <i>B. pumillus</i> <i>Phyllobacterium rubiacearum</i> <i>P. putida</i> <i>Burkholderia solanacearum</i> <i>Rhizobium etli</i>	Antibiose	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>Globodera pallida</i> <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> ;	batata		IRS/LPS	Reitz <i>et al.</i> , 2000
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> ;	pepino	<i>P. fluorescens</i> e <i>S. marcescens</i>	IRS	Liu <i>et al.</i> , 1995a, 1995b 1995c
<i>Colletotrichum orbiculare</i> <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> ;	pepino-campo	<i>P. putida</i> , <i>B. pumilus</i> e <i>S. marcescens</i>	IRS	Wei <i>et al.</i> , 1996
<i>C. orbiculare</i>				
<i>Ralstonia solanacearum</i>	tomate-campo	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. fluorescens</i>	Antibiose	Aino <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizoctonia solani</i>	algodão	<i>Bacillus</i> sp.	Antibiose	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>Sclerotium rolfsii</i>	feijão	<i>Bacillus</i> sp.	Antibiose	Pleban <i>et al.</i> , 1995
<i>Verticillium albo-atrum</i> ; <i>R. solani</i>	batata	<i>Pseudomonas</i> sp.	Antibiose	Nowak <i>et al.</i> , 1995
<i>Fusarium</i> sp.	Cevada, aveia e outros cereais	<i>Pseudomonas* chlororaphis</i>	-	APS Biological Control Committee, 2003

*Produto biológico disponível nos Estados Unidos, denominado Cedomon.

Com relação à indução de resistência sistêmica (IRS) à qual tem sido dada muita ênfase no controle biológico atual, o primeiro relato de bactérias endofíticas mediando esta resistência foi feito em 1991. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r foi aplicado em raízes de cravo onde houve colonização endofítica e após uma semana o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* foi inoculado no caule. As plantas tratadas apresentaram menor incidência e severidade de sintomas que as testemunhas. Foi considerada ISR porque WCS417r não pode ser isolado dos tecidos do caule Van Peer *et al.*, (1991). Segundo Benhamou *et al.* (1998) a eficácia da ISR pode ser elevada quando as bactérias endofíticas são associadas a indutores químicos como quitosana, recomendando-se que a concentração deste não seja deletéria à célula bacteriana

(1 mg ml⁻¹ foi inócuo a *B. pumilus* SE 34). A quitosana juntamente com a BE induz alterações celulares caracterizadas por aumento de aposições ricas em calose sobre o interior da parede celular, na epiderme e córtex exterior.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora diversos sucessos tenham sido relatados no Brasil com o controle biológico através do uso de fungos, incluindo leveduras e estirpes fracas do vírus da tristeza dos citros, bactérias têm sido menos freqüentemente estudadas. Os estudos com BPCP no Brasil devem ser direcionados para as áreas de controle biológico e promoção de crescimento sendo integrados num sistema de manejo sustentável. Aos poucos, os problemas identificados nas pesquisas com o controle biológico vem sendo solucionados. Apesar de ainda haver necessidade de mais pesquisadores trabalhando no tema, algumas pesquisas tem tido continuidade até fermentações, coleção de culturas de antagonistas vem sendo criadas e bons resultados em campo foram obtidos. No entanto, resultados erráticos com relação a bacterização de culturas frustram os pesquisadores e resultam da falta de entendimento da dinâmica das interações planta-microrganismo sob diversas condições ambientais.

BPCP podem ser introduzidas em cultura de tecidos em estádios iniciais de multiplicação e propagadas por sucessivas gerações como epifíticas ou endofíticas multiplicando-se por explantes nodais sem precisar reinocular, influenciando a resposta a estresses bióticos e abióticos. Esses organismos podem agir também por competição, ocupando sítios e tornando-os indisponíveis aos patógenos. No âmbito da agricultura sustentável, certos grupos de organismos podem beneficiar mais de uma cultura num sistema de rotação no campo e misturas rizobactérias-micorrizas podem, além da ação direta, atuar indiretamente melhorando a agregação do solo. Todo este potencial existente precisa ser melhor estudado para que a escolha de estratégias adequadas resulte no sucesso da utilização desta nova alternativa em biotecnologia.

Entre as bactérias promotoras de crescimento de plantas, a utilização do subgrupo das endofíticas constitui uma alternativa ecologicamente correta aos fertilizantes químicos e pesticidas. Esta perspectiva é estimulante não só com relação aos isolados endofíticos selvagens como àqueles que poderão ser otimizados pela identificação de genes envolvidos na habilidade de penetração no hospedeiro, promoção do crescimento e controle de patógenos. A expansão do mercado de bioinoculantes leva a conclusão que, futuramente, as BE poderão ser comercializadas isoladamente ou em misturas, para promoção de crescimento de várias espécies de plantas, micropropagadas ou não, herbáceas ou arbóreas, terrestres ou aquáticas; para obtenção de suprimento adicional de N pelas endofíticas diazotróficas e ainda para indução de resistência sistêmica contra múltiplos patógenos de tecidos radiculares e foliares.

Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região. Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso das BPCP, considerando sua fácil aplicação em tratamento de sementes, raízes e também da parte aérea. Por outro lado, estas bactérias são nativas nos solos ou plantas, não interferindo no equilíbrio ecológico e portanto enquadrando-se plenamente na realidade da agricultura orgânica e sustentável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINO, M., MAEKAWA, Y., MAYAMA, S. & KATO, H. Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonads. In: OGOSHI, A., KOBAYASHI, Y., HOMMA, Y., KODAMA, F., KONDO, N. & AKINO, S. (Eds.) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present status and future prospects. Sapporo. OECD. 1997. pp. 120-123
- ALBUQUERQUE, V.V., TERAQ, D. & MARIANO, R.L.R. Growth-promotion and biocontrol of Fusarium wilt in micropropagated plantlets of *Musa* sp. Anais, 6^o International PGPR Workshop, Kerala. 2003. pp. 3-7.
- ANDRADE, D.E.G.T., GOMES, A.M.A., SILVA, E.B., PEIXOTO, A.R., FERREIRA, A.S., MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Bean seed bacterization with *Bacillus* spp. and fluorescent pseudomonads for *Rhizoctonia solani* biocontrol. In: RYDER M.H., STEPHENS, P.M., BOWEN, G.D. (Ed.) Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Dordrecht. Kluwer. 1994. pp.77-79.
- ANDRADE, D.E.G.T., MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Tratamiento de semillas de algodón con *Pseudomonas* spp. fluorescentes para el biocontrol de *Rhizoctonia solani*. Boletín de Micología 11: 69-74. 1996.
- APS Biological Control Committee. Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens. St. Paul. 2003. Disponível em: <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm>. Acesso em: 21 jul. 2003.
- ASSIS, S.M.P. *Heliconia psitacorum* L.f. – Doenças, pragas e utilização de rizobactérias na promoção de crescimento. (Tese de Doutorado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2002.
- ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., REIS, A., SILVEIRA, E.B. & MICHEREFF, S.J. Ação de rizobactérias no crescimento de rabanete e no controle biológico da podridão negra e da antracnose. Arquivos de biologia e tecnologia 38: 843-850. 1995.
- ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J. & COELHO, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T., COOK, R.J. & ROVIRA, A. (Ed.) Advances in Biological control of Plant Diseases. Beijing, China. China Agricultural University Press. 1996a. pp. 347-353.
- ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J. & COELHO, R.S.B. Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potential biocontrol agents of black rot, on kale phylloplane. In: WENHUA, T., COOK, R.J. & ROVIRA, A. (Ed) Advances in Biological control of Plant Diseases. Beijing, China. China Agricultural University Press. 1996b. pp. 374-379.
- ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. Anais, 4^o International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Sapporo, Japan. 1997. pp.345-348.
- BALDANI, J.I., CARUSO, L., BALDANI, V.L.D., GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology Biochemistry 29:911-922. 1997.
- BARBOSA, M.A.G., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. & MARANHÃO, E.H.A. Biocontrole de *Rhizoctonia solani* em caupi através do tratamento de sementes com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Summa Phytopathologica 21:151-157. 1995.
- BARKA, E.A., BELARBI, A., HACHET, C., NOWAK, J. & AUDRAN, J. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mold of *Vitis vinifera* co-cultured with plant-growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters 186: 91-95. 2000.
- BARKA, E.A., GOGNIES, S., NOWAK, J., AUDRAN, J. & BELARBI, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control 24:135-

142. 2002.

BENHAMOU, N., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain. *Planta* 204:153-168. 1998.

BENTES, J.L.S., ROMEIRO, R.S. & PAUL, P.A. Evidência de resistência sistêmica induzida em tomateiro à mancha bacteriana pequena (*P. syringae* pv. *tomato*) e à mancha alva (*C. cassiicola*) pela microbiolização de sementes com rizobactérias. Anais, 21^o Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu, SP. 1998. p.76.

BETTIOL, W. Biocontrole na fitosfera: problemas e perspectivas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 5:59-97. 1997.

BETTIOL, W. Biological control of plant pathogens in Brazil: Application and current research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 505-510. 1996.

BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. EMBRAPA/CNPDA. 1991.

BLOEMBERG, G.V. & LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion Plant Biology* 4:343-350. 2001.

BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., REIS, V. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137:111-117. 1991.

BOTELHO, G.R., GUIMARÃES, V.F., DEBONIS, M., FONSECA, M.E.F., HAGLER, A.N. & HAGLER, L.C.M. Resumos expandidos, 25^o Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Viçosa, MG. 1995. pp. 541-543.

CAMPELLO, F.B.B. Controle biológico de *Cylindrocladium scoparium* Morgan, agente causal do tombamento de mudas de *Eucalyptus* spp., com bactérias antagonistas. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural Pernambuco. 1992.

CATTELAN, A.J. Aumento no desenvolvimento de plantas de soja através da inoculação com bactérias promotoras do crescimento. Resumos, 24^o Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Goiânia, GO. 1993. pp 341-342.

CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J.A. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31. 1988

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50:149-170. 1998.

CHANWAY, C.P. Forest Sciences Department research highlight—Nitrogen fixing pine Vancouver: Faculty of Forestry/Faculty Agricultural Sciences, Univ. of British Columbia, 2001. Disponível em: <http://www.forestry.ubc.ca/brchline/99dec/fs.htm>. Acesso em: 18 out. 2001.

CHANWAY, C.P., SHISHIDO, M., NAIRN, J., JUNGWIRTH, S., MARKHAN, J., XIAO, G. & HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecological Management* 133:81-88, 2000.

CHEN, C., BAUSKE, E.M., MUSSON, C., RODRIGUEZ-KÁBANA, R. & KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* 5:83-91. 1995.

CONN, K.L., NOWAK, J. & LAZAROVITS, G.A. Gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 801-808. 1997.

DONATO, V.M.T.S., ANDRADE, A.G., TAKAKI, G.M.C., MARIANO, R.L.R. & FRANÇA, J.G.E. Uso de antibióticos para eliminar bactérias endofíticas associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*. 2001. (Prelo).

DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens*

- strains. *New Phytologist* 135:325-334, 1997.
- FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). *Summa Phytopathologica* 17:105-112. 1991.
- FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 13:31-34. 1989.
- FROMMEL, M.I., NOWAK, J. & LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology* 96:928-936. 1991.
- FROMMEL, M.I., NOWAK, J. & LAZAROVITZ, G. Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil* 150:51-60. 1993.
- GILLIS, M., KERSTERS, K., HOSTE, B., JANSSENS, D., KROPPESTEDT, R.M., STEPHAN, M.P., TEIXEIRA, K.R.S., DÖBEREINER, J. & DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing, acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:361-364. 1989.
- GOMES, A.M.A., MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B.; & MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Horticultura Brasileira* 21:699-703. 2003.
- GOMES, A.M.A., PEIXOTO, A.R., MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Efeito do tratamento de sementes de feijão com *Pseudomonas* spp. fluorescentes no controle de *Rhizoctonia solani*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39:537-545. 1996.
- HALLMANN, J. Plant interactions with endophytic bacteria. In: JEGER, M.J. & SPENCE, N.J. (Eds.) *Biotic interactions in plant-pathogen associations*. London. CAB International. 2001. pp. 87-119.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial Endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43: 895-914. 1997.
- HERMAN, E.B. Contaminants promote potato micropropagation. *Agricell Report* 9:38. 1987.
- JAMES, E.K., REIS, V.M., OLIVARES, FL., BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757-766. 1994.
- KLOEPPER, J.W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U.S. *Anais, International Symposium on Clean Agriculture*. Sapporo, Japan. 1997. pp.49-52.
- LAZAROVITZ, G. & NOWAK, J. Rhizobacterium for improvement of plant growth and establishment. *Hortscience* 32:188-192. 1997.
- LI, R.P. & MACRAE, I.C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology Biochemistry* 23:999-1002. 1991.
- LIMA, E., BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biology Biochemistry*. 19:165-170. 1987.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695-698, 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:843-847, 1995b.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root

- colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068, 1995c.
- LUNA, C.L., MARIANO, R.L.R. & SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19:133-140. 2002.
- LUZ, W.C. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em semente de trigo. *Fitopatologia Brasileira* 28:093-095. 2003a.
- LUZ, W.C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. *Fitopatologia Brasileira* 28:37-40. 2003b.
- LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira* 13:82-85. 1993a
- LUZ, W.C. Efeito da microbiolização de sementes no rendimento e controle da podridão comum das raízes e de patógenos das sementes de trigo. *Fitopatologia Brasileira* 19:144-148. 1994.
- LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:35-77. 1993b.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:1-49. 1996.
- MANTOVANELLO, C.M. & MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Summa Phytopathologica* 20:123-126. 1994.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:369-409. 1993.
- MCINROY, J. A. & KLOPPER, J. W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: O'GARA, F., DOWLING, D.N. & BOESTEN, B. (Eds.) *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms*. Weinheim. VCH Verlags Gesellschaft. 1994. pp. 19-28.
- MELLO, M.R. F., MARIANO, R. L.R., MENEZES, M., CÂMARA, T. R. & ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathologica* 28:222-228. 2002.
- MELLO, M.R.F. Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2002.
- MELO, R.A.G., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J., MENEZES, M. & COELHO, R.S.B. Controle biológico da podridão mole do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Summa Phytopathologica* 21:206-212. 1995.
- MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Controle Biológico de doenças de plantas. Periódicos existentes no Brasil e onde encontrá-los - Guia Básico. Recife. Imprensa Universitária-UFRPE. 1993.
- MONTEIRO, L., MARIANO, R.L.R. & SOUTO-MAIOR, A.M. Production of active compounds against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by *Bacillus* species. In: *Anais, XIV Simpósio Nacional De Fermentações*, Florianópolis, SC. 2003. CD Rom.
- MOURA, A. B. & ROMEIRO, R. S. Avaliação *in vitro* do potencial antagonístico de actinomicetos contra *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana do tomateiro. *Ciência e Prática* 23:281 – 288. 1999.
- MOURA, A. B., ROMEIRO, R.S. & NEVES, M. C. P. Bioensaio para avaliação massa de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 23:2065-2072. 1998.
- MOURA, A.B. & ROMEIRO, R.S. Actinomicetos pré-selecionados para controle de *Ralstonia solanacearum* como promotores de crescimento em tomateiro. *CERES* 47:613 – 626. 2000.

- MOURA, A.B. Actinomicetos como potenciais agentes de controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro incitada por *Pseudomonas solanacearum*. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. *Advances in Agronomy* 29:1-39. 1977.
- NORONHA, M.A., MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira* 20:174-178. 1995.
- NOWAK, J., BENSALIM, S., SMITH, C., DUNBAR, C., ASIEDU, S.K., MADANI, A., LAZAROVITS, G., NORTHCOTT, D. D. & STURZ, A. V. Behaviour of plant material issued from *in vitro* bacterization. *Potato Research* 42:505-519. 1999.
- NOWAK, J., ASIEDU, S. K., BENSALIM, S., RICHARDS, J., STEWART, A., SMITH, C., STEVENS, D. & STURZ, A. V. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:97-103. 1998.
- NOWAK, J., ASIEDU, S.K., LAZAROVITZ, G., PILLAY, V.K., STEWART, A., SMITH, C. & LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P. (Eds.) *Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures*. France. Commissariat à l'énergie atomique. 1995. pp. 173-179.
- PEIXOTO, A.R., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J. & OLIVEIRA, S.M.A. Ação antagonica de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. *Summa Phytopathologica* 21:219-224. 1995.
- PEREIRA, L.S. & BALDANI, J.I. Estudos da ocorrência de *Acetobacter diazotrophicus* em solo através do uso de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar e de técnicas moleculares. Resumos, 7ª Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. Seropédica, RJ. 1999. p. 122.
- PERONDI, N.L., DA LUZ W.C. & THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. *Fitopatologia Brasileira* 21:243-249. 1996.
- PLEBAN, S., INGEL, F. & CHAT, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology* 101:665-672. 1995.
- REIS, V.M., OLIVARES, F.L., OLIVEIRA, A.L.M., REIS JÚNIOR, F.B., BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil* 206: 205-211. 1999.
- REITZ, M., RUDOLPH, K., SCHRÖDER, I., HOFFMANN-HERGARTEN, S., HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as na inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied Environmental Microbiology* 66:3515-3518. 2000.
- ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: Bettiol, W (Org). *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna. EMBRAPA/CNPDA. 1991. pp.121-133.
- SCHLOTTER, M. & HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis* 25:159-179. 1998.
- SILVA, J.B., MATOS, J.A.R., MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Efeito da bacterização de sementes de algodoeiro no controle de *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira* 21: 342-348. 1996.
- SILVA, L.G., OLIVARES, F.L., REIS, V.M. & BODDEY, R.M. Localização e quantificação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* BR11175 em cana-de-açúcar micropropagada var. SP70-1143.

- Resumos, FertBio98. Caxambu, MG. 1998. p. 600.
- SILVEIRA, E.B., GOMES, A.M.A., MARIANO, R.L.R. & SILVA NETO, E.B. Utilização de bactérias na produção de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**. 2004. (Prelo).
- STEIN, R.L.B. Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no controle *in vitro* de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1988.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. Biocontrole de *Rosellinia necatrix* com rizobactérias em macieiras. **Summa Phytopathologica**. 27: 43-49. 2001.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R., KRETZSCHMAR, A. A. & BORSÓI, M. Avaliação de organismos antagonicos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós colheita. **Fitopatologia Brasileira**. 17: 423-429. 1992.
- VAN PEER, R., NIEMANN, G.J. & SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology** 81:728-34. 1991.
- WEBER, O.B., BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 2227-2285. 2000.
- WEBER, O.B., CORREIA, D., SILVEIRA, S.R.M., CRISÓSTOMO, A.L., OLIVEIRA, M.E. & SÁ, G.E. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 38: 689-696. 2003.
- WEI, G., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology** 86:221-224. 1996.
- WENHUA, T. & HETONG, Y. Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. **Anais**, 4^o International Workshop On Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.. Sapporo, Japan. 1997. pp.2-9.
- YAO, C., ZEHNDER, G.W., MURPHY, J. & KLOEPPER, J.W. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion in tomato with selected RPCP strains. In: OGOSHI, A., KOBAYASHI, Y., HOMMA, Y., KODAMA, F., KONDO, N. & AKINO, S. (Ed.) **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present status and future prospects**. Sapporo. OECD. 1997. pp. 285-8.
- ZEHNDER, G., KLOEPPER, J., TUZUN, S., YAO, C., WEI, G., CLAMBLISS, O. & SHELBY, R. Insect feeding on cucumber mediate by rhizobacteria-induced plant resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 83:81-85. 1997a.
- ZEHNDER, G., KLOEPPER, J., YAO, C. & WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology** 90:391-396. 1997b.
- ZHANG, S-A., XU, W-M., YAN, Z-N. & MEI, R-H. Research and commercialization of yield increasing bacteria (YIB) in China. In: TANG, W., COOK, R.J. & ROVIRA, A. (Eds) **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing. China Agricultural University Press. 1996. pp. 47-53.