

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR (*Pythium
aphanidermatum*) EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS**

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Dezembro/2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR (*Pythium
aphanidermatum*) EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS**

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

Orientador: **Prof. Dr. Wagner Bettiol**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Dezembro/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C824c	<p>Corrêa, Élide Barbosa, 1979- Controle biológico da podridão radicular (<i>Pythium aphanidermatum</i>) / Élide Barbosa Corrêa. - Botucatu : [s.n.], 2009. ix, 133 f. : gráfs., tabs.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009 Orientador: Wagner Bettiol Inclui bibliografia.</p> <p>1. Controle biológico. 2. Hidroponia. 3. Podridão radicular. 4. Manguezal. 5. <i>Pythium</i>. 6. <i>Pseudomonas</i>. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.</p>
-------	---


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR (Pythium
aphanidermatum) EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS"

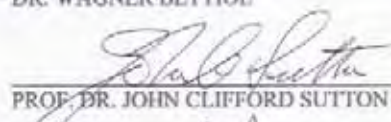
ALUNA: ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

ORIENTADOR: DR. WAGNER BETTIOL

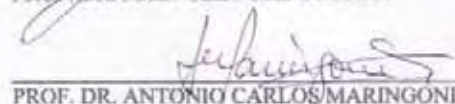
Aprovado pela Comissão Examinadora



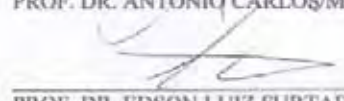
DR. WAGNER BETTIOL



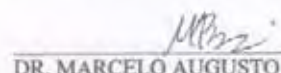
PROF. DR. JOHN CLIFFORD SUTTON



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



DR. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI

Data da Realização: 17 de dezembro de 2009.

BIOGRAFIA

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA – Nascida em 17 de setembro de 1979, na cidade de São Paulo, SP. Filha de Sidnei Corrêa e Vilma P. B. Corrêa. Ingressou no Curso de Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, em fevereiro de 1999 graduando-se em janeiro de 2004. Em março de 2004, iniciou o Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, obtendo o título em fevereiro de 2006. Em março de 2006 iniciou o doutorado, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, na cidade de Botucatu, SP, realizando Doutorado Sanduíche no Departamento de Microbiologia Ambiental, na Universidade de Guelph, Guelph, Canadá.

*Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só;
mas sonho que se sonha junto é realidade.*

Raul Seixas

A Deus e ao meu anjo da guarda, por sempre terem me amparado e iluminado, muitas vezes sem a minha percepção.

Aos meus pais, Sidnei e Vilma, pelo colo repleto de amor e compreensão que sempre me ofereceram sem cobranças e julgamentos.

Ao meu irmão, Rod, pelo amor e companheirismo.

Com todo o amor e gratidão dedico

Dizem que o nosso anjo da guarda se comunica conosco através dos nossos amigos...eu concordo plenamente.

Essa tese é oferecida aos meus amigos que me apoiaram durante toda essa interessante e iluminada trajetória do doutorado, repleta de felicidade e luta por um sonho. Sendo assim, a ofereço a todos os meus amigos, e em especial

aos amigos:

Abrahão Haddad Galvão

Kátia C. Kupper

Isabeli Bruno e Kelly Rocha

Homenagens

Prof. Dr. Wagner Bettiol:

Orientador e amigo.

Obrigada pela orientação, paciência e liberdade de pensamento e ações.

Prof. Dr. John C. Sutton:

Orientador e amigo.

Obrigada pela paciência, orientação e “adoção” durante o período convívio no Canadá.

Os ensinamentos doados por vocês irão me acompanhar durante toda a minha trajetória. Muitíssimo obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as alegrias e provações que me fazem crescer a cada segundo vivido e por ter me apresentado tantas pessoas iluminadas que tornaram a minha caminhada durante o doutorado *quite* especial.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu (FCA), pela realização do curso.

À Universidade de Guelph, pela oportunidade de realização de parte da tese nas suas instalações.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudo no Brasil.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudos no Canadá.

À Embrapa Meio Ambiente, por toda a infra-estrutura oferecida e por ter sido a minha “segunda” casa durante esses anos.

Ao Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da FCA, pela grande suporte oferecido durante o andamento do doutorado.

À Seção de Pós-Graduação da FCA, pela ajuda e suporte.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo suporte em todos os campos da minha vida, amor e compreensão e confiança.

Ao meu orientador, Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, confiança depositada, paciência, amizade, liberdade de pensamentos e diversas oportunidades oferecidas, essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador canadense, Dr. John C. Sutton, pela orientação, confiança e amizade, que fizeram do meu período vivido no Canadá essencial para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela amizade, boa vontade, profissionalismo e extremo comprometimento com o Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, e com a constante melhora de formação dos seus alunos.

Aos professores do Departamento Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da FCA, Antônio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado, Renate Krause Sakate, Carlos Gilberto Raetano e Silvia Renata S. Wilcken pelo profundo profissionalismo e preocupação com a qualidade dos alunos formados.

Ao Prof. Nilton, que está vivendo em outro plano, que foi muito importante para a minha formação profissional com tantos ensinamentos sábios.

Ao Prof. Furtado, pela amizade e ajuda no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Maringoni, pela amizade e ensinamentos profissionais.

À secretária da Proteção de Plantas e amiga, Ritinha, pela ajuda constante em todos os momentos necessários.

As amigas da FCA, Adriane e Maria do Carmo, pela constante ajuda, boa vontade e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, Itamar Soares de Melo, Marcelo Morandi e Raquel Ghini, pelos ensinamentos.

A minha amiga, Emília Hamada, da Embrapa Meio Ambiente, pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu amigo, Prof. Goes, da minha querida FCAV, pela amizade, força e ensinamentos.

Ao meu grande amigo, Abraão Haddad, por ter sido um *huge* amigo de todas as horas e colega de trabalho essencial para que essa tese se tornasse realidade.

A minha amiga Laura Santi, pelas inúmeras ajudas oferecidas nos campos profissionais e pessoais.

A minha irmã de coração, Kelly Cristina, pela convivência, amizade, ensinamentos e apoio durante todos esses anos.

A minha irmã de coração, Isa, pela paciência, convivência, amizade e ajuda em todos os campos da minha vida.

Ao meu amigo e irmão de coração, Flávio H. Medeiros, pelos incentivos e ajudas.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Rosely, Marcia, Elke e João, pela enorme boa vontade e ajuda na condução dos experimentos e na condução da vida.

Aos colegas do Setor de Campos Experimentais da Embrapa Meio Ambiente, Valdemore, Valdecir, Brasilino e Chiquinho, pela ajuda e boa vontade durante a condução dos experimentos.

As amigas, Luciana Reyes e Sarah, pela pronta ajuda e boa vontade no desenvolvimento do Projeto Manguezais e pela camaradagem de sempre.

A amiga, Liliana, pela boa vontade e cooperação.

Aos amigos e amigas da Embrapa, Ricardo, Zayame, Luciana Ávila, Andiale, Marina, Rute, Fernanda, Gabriela, Alexandre, Élen, Flávia, Guta, Lívia, Eduardo Gottardo, Eduardo Bernardo, Tiago, Fábio por tantos momentos legais vividos.

A amiga, Coralie Sopher, pela amizade e constante ajuda durante o período vivido na Canadá.

A amiga técnica de laboratório do Prof. Sutton, Jane Ma, pela amizade, boa vontade e constante ajuda no desenvolvimento dos experimentos no Canadá.

As minhas queridas irmãs que eu tive a felicidade de conhecer no Canadá: Wendy, Nuria e Luana, que colocaram mais luz na minha vida.

Obrigada from the bottom of my heart!!!

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1 Cultivo hidropônico	7
4.2 Podridão radicular causada por <i>Pythium aphanidermatum</i>	8
4.3 O gênero <i>Pythium</i>	10
4.4 Controle da podridão radicular em hidroponia	10
4.5 Controle biológico da podridão radicular	12
4.6 Formulação de agentes de biocontrole	13
CAPÍTULO 1	
Controle biológico da podridão radicular causada por <i>Pythium aphanidermatum</i> e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos residentes de manguezais	15
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão	25
Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO 2	
Efeito de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28 e <i>Bacillus subtilis</i> GB03 sobre a podridão radicular causada por <i>Pythium aphanidermatum</i> e o desenvolvimento de pimentão hidropônico	41
Resumo	42
Abstract	43
Introdução	44

Material e Métodos	46
Resultados	50
Discussão	57
Referências bibliográficas	61
CAPÍTULO 3	
Controle biológico da podridão radicular (<i>Pythium aphanidermatum</i>) e promoção de crescimento com <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28 e <i>Bacillus subtilis</i> GB03 em alface hidropônica	84
Resumo	85
Abstract	86
Introdução	86
Material e Métodos	87
Resultados e Discussão	91
Referências bibliográficas	93
CAPÍTULO 4	
Formulação de <i>Pseudomonas</i> spp. e promoção de crescimento de alface Hidropônica	102
Resumo	103
Abstract	104
Introdução	105
Material e Métodos	107
Resultados	110
Discussão	112
Referências bibliográficas	116
5 CONCLUSÕES GERAIS	127
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1 RESUMO

O cultivo hidropônico de hortaliças vem crescendo e se tecnificando no Brasil. No entanto, podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* constituem um sério problema para a sua expansão. Uma vez o patógeno instalado no sistema, esse pode ser suprimido por meio da adição de microrganismos antagônicos. Além de suprimirem a podridão radicular, esses microrganismos introduzidos na solução nutritiva podem promover o crescimento das plantas, aumentando a receita do produtor. Entretanto, muitas vezes verifica-se baixa sobrevivência dos microrganismos adicionados na solução nutritiva. O desenvolvimento de formulações de agentes de controle biológico, principalmente de bactérias do gênero *Pseudomonas*, é um fator chave para a sua utilização em escala comercial. Devido à importância da podridão radicular em cultivos hidropônicos e o potencial de utilização do controle biológico da doença, os objetivos do presente trabalho foram (i) selecionar microrganismos residentes do manguezal como agentes de biocontrole da podridão radicular e promotores de crescimento em pepino hidropônico; (ii) avaliar o controle biológico da podridão radicular e a promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em pimentão e alface cultivados em hidroponia; (iii) desenvolver uma formulação de *Pseudomonas* spp.. Em condições de

casa de vegetação, *Bacillus cereus* AVIC-3-6, isolado de manguezal, protegeu as plantas de pepino do subdesenvolvimento causado pelo patógeno; *Gordonia rubripertincta* SO-3B-2 e *Pseudomonas stutzeri* MB-P3A-49, também isolados de manguezal, promoveram o crescimento de plantas de pepino não inoculadas com o patógeno. A adição de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 na solução nutritiva de pimentão cultivado em hidroponia e inoculado com *P. aphanidermatum* teve efeito positivo na supressão dos danos causados pelo patógeno. A formulação de *Pseudomonas* spp. em fibra de coco com 80% de umidade a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ propiciou a maior vida-de-prateleira, sendo essa de 32 semanas. Diante dos resultados encontrados, conclui-se que: a) microrganismos isolados de manguezais são promissores agentes de controle biológico da podridão radicular e promotores de crescimento de plantas, em cultivos hidropônicos; b) *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 atuam na supressão dos danos causados pela podridão radicular em pimentão cultivado em hidroponia; c) fibra de coco, com elevada umidade, pode ser utilizada na formulação de *Pseudomonas* spp. em escala comercial.

BIOLOGICAL CONTROL OF THE ROOT ROT (*Pythium aphanidermatum*) IN HYDROPONIC CROPS

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

Adviser: WAGNER BETTIOL

2 SUMMARY

Hydroponic production of vegetables and flowers is increasing in Brazil, and the production technology is improving. A major factor constraining crop productivity is root rot caused by *Pythium* spp. Root rot severity can be reduced by the application of appropriate antagonistic microbes into the hydroponic nutrient solution or root zone of the crops. When in the root zone beneficial microbes may suppress progress of the root rot and increase crop productivity. However some beneficial microbes are not

well-adapted to hydroponic environments and do not survive well in plant nutrient solutions. Ecologically-adapted microbes that are effective against root rot are a key factor for successful root rot control in hydroponic crops. The need for effective biological agents that are adapted to hydroponic systems and appropriately formulated for commercial use prompted investigations with the following aims: i) to select bacterial strains from among isolates obtained from mangrove swamps for effectiveness in controlling *Pythium* root rot in hydroponic cucumber; ii) to evaluate *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 for controlling root rot and promoting growth of hydroponic lettuce and pepper; and iii) to assess formulations of *Pseudomonas* spp. for long-term shelf life. *Bacillus cereus* AVIC -3-6 from a mangrove reduced stunting of hydroponic cucumbers associated with *Pythium* root rot. *Gordonia rubripertincta* SO-3B-2 and *Pseudomonas stutzeri* MB-3PA-49 from a mangrove increased growth of healthy cucumber plants. Application of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 into the nutrient solution of hydroponic pepper suppressed root rot and increase the plant growth. Among tested formulations of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, a formulation with coconut fibre of 80% moisture content had the longest shelf life (up to 32 weeks) when kept at at 3°C. We conclude that a) microorganisms from mangroves are useful as biocontrol agents and for growth promotion in hydroponic crops; b) *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 are able to suppress root rot in hydroponic pepper; c) coconut fibre with high water content, has value as a carrier in formulations *Pseudomonas* spp. for commercial use.

3 INTRODUÇÃO

O cultivo hidropônico encontra-se em plena expansão no Brasil (FURLANI, 2008). No entanto, podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* incidem sobre todas as culturas produzidas em hidroponia, podendo causar perdas de até 100% na produção (SUTTON et al., 2006). Dentre as medidas de controle da doença, a adição de microrganismos antagônicos ao patógeno e promotores de crescimento de plantas na solução nutritiva se destaca como uma medida eficiente e ecologicamente viável.

Um entrave ao controle biológico e a promoção de crescimento em hidroponia é a baixa sobrevivência de microrganismos adicionados na solução nutritiva. Esse problema pode ser resolvido por meio da seleção de microrganismos em locais similares ao ambiente hidropônico, como por exemplo, manguezais.

A ampliação e o uso do controle biológico na agricultura dependem do desenvolvimento de formulações de agentes de biocontrole que propiciem uma vida-de-prateleira adequada à comercialização do produto e que preservem ou melhorem a capacidade de biocontrole e a promoção de crescimento dos bioagentes.

O presente trabalho teve como objetivos (i) selecionar microrganismos residentes de manguezal como agentes de controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promotores de crescimento de plantas de pepino hidropônico, (ii) avaliar o controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e a promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em pimentão e alface cultivados em hidroponia; (iii) desenvolver uma formulação à base de *Pseudomonas* spp.

Para atingir os objetivos do trabalho, a tese foi dividida em quatro capítulos, na forma de artigos científicos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Controle biológico da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos residentes de manguezais”, redigido conforme as normas da revista Summa Phytopathologica; o segundo capítulo “Efeito de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 sobre a podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico”, redigido nas normas da revista Canadian Journal of Plant Pathology; o terceiro capítulo “Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica”, redigido conforme as normas da revista Summa Phytopathologica; e o quarto capítulo “Formulação de *Pseudomonas* spp. e promoção de crescimento de alface hidropônica”, redigido nas normas da revista Canadian Journal of Plant Pathology.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Cultivo hidropônico

A substituição da solução do solo por uma solução composta por macro e micronutrientes, formulada de acordo com as exigências de cada espécie vegetal, utilizando ou não substratos orgânicos ou inorgânicos para o suporte das plantas denomina-se cultivo hidropônico. Desde o início do seu emprego em escala comercial, no ano de 1940, o cultivo hidropônico vem crescendo em todo o mundo (FURLANI, 2008; FURLANI et al., 1999; STANGHELLINI & RASMUSSEN, 1994). O crescimento do cultivo hidropônico é devido às vantagens proporcionadas na produção vegetal por esse sistema, como a padronização da produção, a antecipação do ciclo da cultura, a redução no uso da água, a eficiência do uso de fertilizantes e a maior produção por área (FURLANI et al., 1999). Essas vantagens são em grande parte responsáveis pela utilização de solução nutritiva que fornece os nutrientes necessários, mantendo junto às raízes a composição e a concentração adequada de nutrientes, além do controle do pH da solução, mantendo esse

em faixas adequadas para a absorção de nutrientes (FAQUIN & FURLANI, 1999; FERNANDES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002).

Atualmente, a produção hidropônica se concentra em hortaliças e flores, sendo empregada na produção de alface, rúcula, agrião, almeirão, couve, coentro, salsinha, cebolinha, salsa, tomate, pepino, pimentão, morango, tubérculos e flores (CHATTERTON et al., 2004; FAQUIN & FURLANI, 1999; MORAES & FURLANI, 1999; MEDEIROS et al., 2002; PAULITZ et al., 1992). No Brasil, a principal cultura produzida em hidroponia é a alface, sendo essa produção localizada principalmente próxima as regiões metropolitanas.

Desde a sua criação, os sistemas hidropônicos vêm sendo modificados para a melhor adaptação às condições ambientais e sócio econômicas de cada região, visando o aumento da qualidade e da produtividade das culturas (ANDRIOLO et al., 2004). Os principais sistemas hidropônicos empregados são o *nutrient film technique* (NFT), o *deep film technique* (DFT) ou *floating*, o cultivo em substrato e a aeroponia. O sistema NFT é a técnica mais empregada no Brasil para o cultivo de hortaliças de folhas, onde a solução nutritiva é bombeada para os canais e escoada por gravidade, formando uma fina lâmina de solução que irriga as raízes. A técnica de DFT é empregada com a utilização de uma lâmina profunda de solução nutritiva (5 a 20 cm), onde as plantas são acondicionadas em mesa plana onde a solução circula por meio de bombeamento e gravidade. O cultivo em substratos é utilizado principalmente para as culturas que possuem elevado porte, como pepino, pimentão e tomate, onde a solução nutritiva circula através do substrato, geralmente inerte, como a areia, a argila expandida, a vermiculita, a lã de rocha, a turfa e a fibra de coco, retornando ao tanque de solução nutritiva. No cultivo em aeroponia as raízes das plantas ficam suspensas recebendo água e nutrientes por atomizadores (FAQUIN & FURLANI, 1999; FURLANI et al., 1999).

4.2 Podridão radicular causada por espécies de *Pythium*

Os patógenos que acometem culturas produzidas em hidroponia são os mesmos que incidem sobre as culturas produzidas no campo. Dentre as doenças que incidem sobre as culturas em hidroponia, as podridões radiculares causadas por espécies de

Pythium destacam-se entre as mais importantes, podendo inviabilizar a produção (STANGHELLINI & RASMUSSEN, 1994; UTKHEDE et al., 2000). As razões para a importância de podridões radiculares em hidroponia estão relacionadas com a circulação da solução nutritiva, alta adaptação do patógeno ao ambiente aquático, emprego de elevada densidade de plantas e baixa diversidade biológica no sistema (PAULITZ & BÉLANGER, 2001; SUTTON et al., 2006).

O ciclo da podridão radicular causada por *Pythium* spp. em hidroponia constitui-se das fases de sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução. A sobrevivência do patógeno é realizada por meio de esporos de reprodução sexuada resistentes a condições adversas (oósporos) aderidos no sistema, de atividade saprofítica nos restos vegetais, em plantas doentes, e vetores (*Scatella stagnalis*, Diptera). A disseminação, a curtas e longas distâncias, ocorre através de água e solo contaminados com estruturas do patógeno ou tecidos vegetais doentes, aderidos às ferramentas, sapatos, poeira, sementes, mudas, substratos e por meio de insetos vetores (FAVRIN et al., 1988; GOLDBERG & STANGHELLINI, 1990; MARTIN & LOPER, 1999; OWEN-GOING et al., 2003). A infecção do patógeno ocorre através de esporângios, zoósporos, micélio e oósporos. A germinação de esporângios e oósporos pode ser direta, através da emissão do tubo germinativo ou indireta, por meio da produção de zoósporos. De acordo com ENDO & COLT (1974), zoósporos e micélio são as principais estruturas de infecção em hidroponia. A colonização das raízes, intracelular e intercelular, pode seguir o estágio biotrófico com a passagem para o necrotrófico, ou permanecerem durante todo o ciclo vegetal como estágio biotrófico. O estágio biotrófico se inicia após a penetração do patógeno, durante o período onde é possível realizar o seu isolamento sem que ocorram os sintomas característicos da colonização, como a podridão radicular, murcha e morte das plantas. A reprodução assexuada e sexuada de *Pythium* spp. ocorre em tecidos infectados e na mucilagem radicular. Além do sintoma clássico de podridão radicular, o parasitismo por *Pythium* spp. causa o subdesenvolvimento vegetal, a diminuição da frutificação, o escurecimento vascular e a murcha das plantas (SUTTON et al., 2006; ZHENG et al., 2000).

4.3 O gênero *Pythium*

O gênero *Pythium* é constituído por aproximadamente 120 espécies, que ocupam diversos habitats terrestres e aquáticos, sendo parasitas ou saprofíticos (VAN DER-PLATTS-NITERINK, 1981). As espécies de *Pythium* listadas como agentes causais da podridão radicular em hidroponia são *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare*, *P. intermedium*, *P. myriotylum* *P. ultimum* var *ultimum* e *Pythium* grupo F (FAVRIN et al. 1988; GRAVEL et al., 2005; HERRERO et al., 2003; JENKINS & AVERRE, 1983; LIU et al., 2007; SCHUERGER & PATEGAS, 1984; STANGHELLINI & KRONLAND, 1986). Dentre as espécies citadas, *P. aphanidermatum* é a mais comumente encontrada em cultivos hidropônicos, causando as maiores perdas (FAVRIN, 1988; UTKHEDE et al., 2000).

Microrganismos do gênero *Pythium*, pertencem ao filo Oomycota, sendo classificados como pertencentes ao Reino Straminipila (DICK, 2001). As características do filo Oomycota são a formação de esporos sexuais (oósporos) e assexuais móveis heterocontos (flagelo do tipo tinsel e chicote), denominados zoósporos; a maior parte da constituição da parede celular é de celulose, a fase vegetativa diplóide, e as cristas mitocondriais tubulares.

4.4 Controle da podridão radicular em hidroponia

Atualmente não existem variedades resistentes à doença e fungicidas registrados para o seu controle em hidroponia no Brasil. Devido à impossibilidade de utilização do controle genético e químico, o controle da podridão radicular em hidroponia requer a integração de práticas culturais de manejo da cultura visando principalmente o impedimento da entrada do patógeno no sistema e a diminuição da suscetibilidade das plantas.

Com o conhecimento do ciclo da doença, podemos listar as medidas de controle baseadas na redução da disseminação do patógeno, da infecção, da colonização, da reprodução e da sobrevivência. A principal forma de controle da disseminação do patógeno, a curtas e longas distâncias, é realizada com a utilização de água e substratos isentos de estruturas do patógeno e mudas sadias, pois esses são os principais veículos de

entrada do patógeno no sistema (SUTTON et al., 2006). A infecção e a colonização do patógeno podem ser controladas por meio da utilização de agentes de biocontrole (MARTIN & LOPER, 1999), de biossurfactantes e surfactantes (STANGUELLINI & MILLER, 1997; DE JONGHE et al., 2005), da desinfestação da solução nutritiva por meio da radiação UV, elevadas temperaturas e filtração (GOLDBERG et al., 1992; STANGUELLINI et al., 1984; TANAKA et al., 2003). Microrganismos controlam a infecção por *Pythium* spp. através da competição por sítios de infecção com o patógeno, reduzindo a atração, encistamento e germinação de zoósporos (ZHOU & PAULITZ, 1993), e por meio da produção de antibióticos e biossurfactantes que causam a ruptura da membrana celular dos zoósporos (STANGUELLINI & MILLER, 1997). A colonização do patógeno é suprimida por meio da ativação de mecanismos de resistência nas plantas, tornando as plantas mais tolerantes. A desinfestação da solução nutritiva através de filtração, elevadas temperaturas e radiação UV diminuem o inóculo no sistema; entretanto, não afetam o inóculo presente na zona radicular (KHAN et al., 2003). A minimização de ferimentos radiculares, principalmente durante o transplante das plantas, diminui a atração dos zoósporos por exsudados radiculares. Como a reprodução e a sobrevivência de *Pythium* spp. ocorre em raízes, tecidos infectados e na mucilagem radicular, a retirada das plantas doentes e de resíduos vegetais, assim como a desinfestação do sistema hidropônico por meio do uso de soluções desinfestantes (hipoclorito de sódio e dióxido de cloro) são importantes medidas para o controle da doença. Moscas, como *fungus gnats* (*Bradysia* spp. e *Scatella stagnalis*, Diptera), devem ser eliminadas do sistema hidropônico, pois atuam como agentes de disseminação de *Pythium*, além de serem hospedeiros do patógeno (GOLDBERG & STANGUELLINI, 1990).

As doenças de plantas são uma interação entre hospedeiro, ambiente e patógeno. Onde o hospedeiro é suscetível ou tolerante, o ambiente favorável a expressão dos mecanismos de infecção do patógeno, e não favorável a expressão dos genes de resistência das plantas (BERGAMIM FILHO et al., 1995). Atualmente, fatores como elevadas temperaturas, baixa oxigenação da solução nutritiva, presença de compostos fenólicos, picos de condutividade elétrica e pH da solução nutritiva e a presença de algas no sistema são conhecidos por aumentarem a predisposição das plantas e a suscetibilidade as podridões radiculares. Conhecidos os fatores do ambiente responsáveis por agravarem os

danos causados pela doença, esses devem ser minimizados e evitados (BOROWITZKA, 1995; CHÉRIF et al., 1997; KHAN et al., 2003; SUTTON et al., 2006).

4.5 Controle biológico da podridão radicular

Uma das causas da elevada condutividade de cultivos hidropônicos à podridões radiculares é a baixa população e diversidade microbiana encontrada nesse sistema, principalmente no início do desenvolvimento das culturas. Devido a baixa população e diversidade microbiana em sistemas hidropônicos, não existe competição e antagonismo contra o patógeno. Todavia, a presença de baixa população microbiana facilita o estabelecimento de microrganismos antagônicos ao patógeno e promotores de crescimento no sistema (SUTTON et al., 2006).

A adição de microrganismos benéficos na solução nutritiva de cultivos hidropônicos é uma medida eficiente de controle e supressão da podridão radicular e de promoção de crescimento de plantas em hidroponia, sendo demonstrado por vários autores (CHATTERTON et al., 2004; CORRÊA & BETTIOL, 2009; GARCÍA et al., 2004; LIU et al., 2007; PAULITZ et al., 1992; RANKIN & PAULITZ, 1994; ZHENG et al., 2000). Os mecanismos de ação listados no controle biológico da podridão radicular em hidroponia são a competição por espaço e nutrientes, a antibiose, a indução de resistência e a promoção de crescimento (GARCÍA et al., 2004; PAULITZ et al., 1992; ZHENG et al., 2000). A competição entre *P. chlororaphis* e *P. aphanidermatum* pela mucilagem radicular, base para o crescimento saprofítico do patógeno, atua como um dos mecanismos de ação de *P. chlororaphis*, aliado a indução de resistência e antibiose (EPA, 2009; ZHENG et al., 2000).

Um dos entraves para a utilização do controle biológico em hidroponia é a baixa sobrevivência dos agentes de biocontrole introduzidos no ambiente. Essa baixa sobrevivência pode ser explicada pelo local de isolamento dos agentes de biocontrole estudados, sendo a maioria deles obtidos do ambiente terrestre (CORRÊA, 2006; KHAN et al., 2003). O isolamento de microrganismos em locais similares a cultivos hidropônicos, aumenta as chances de seleção de agentes de biocontrole adaptados às

condições aquáticas, melhorando a eficiência no controle das doenças e na promoção de crescimento de plantas.

4.6 Formulação de bactérias como agentes de biocontrole

A formulação de agentes de biocontrole é um passo fundamental para a utilização desses microrganismos na agricultura. Dentre as vantagens da formulação de bioagentes podemos listar o aumento da vida-de-prateleira dos microrganismos, da eficácia, do crescimento e da sobrevivência no meio ambiente; aliados a compatibilidade com as práticas culturais (MARTIN & LOPER, 1999). Diferentes produtos podem ser utilizados na formulação de agentes de biocontrole, sendo esses orgânicos ou inorgânicos, como por exemplo, o talco, a turfa, a caulinita e a vermiculita (NAKKEERAN et al., 2005).

Formulações com bactérias Gram-positivas, como as do gênero *Bacillus*, são muito mais frequentes no mercado, quando comparadas com formulações de bactérias Gram-negativas, como, por exemplo, as pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (BETTIOL et al., 2009). Bactérias do gênero *Bacillus* produzem endósporos, estruturas de resistência que garantem ampla vida-de-prateleira para o produto formulado. Como exemplo da maior vida-de-prateleira de produtos formulados com os diferentes grupos de bactérias pode ser citado a de dois anos do produto Companion[®], formulado com *Bacillus subtilis* GB03, e a vida-de-prateleira de 56 dias do produto Cedomon[®] e Cerall[®], formulados com *Pseudomonas chlororaphis*, nas mesmas temperaturas (GROWTH PRODUCTS, 2009; LANTMANNEN, 2009).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem elevado potencial para o desenvolvimento de produtos comerciais, devido a alta efetividade no controle de doenças de plantas da parte aérea e do sistema radicular em diferentes tipos de cultivos (KHAN et al. 2003; NAKKEERRAN et al. 2006; STOCKWELL & STACK, 2007). Diversos mecanismos de ação de controle biológico de doenças de plantas têm sido descobertos com o estudo desse gênero de bactérias (BAKKER et al. 2007; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; KLOEPPER et al. 1992). Entretanto, são poucos os estudos com relação à formulação de *Pseudomonas*. Esse fato pode ser explicado devido à sensibilidade

desse gênero as condições adversas, e conseqüentemente difícil formulação e aplicação comercial (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

CAPÍTULO 1

CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR CAUSADA POR *Pythium aphanidermatum* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PEPINO HIDROPÔNICO COM MICRORGANISMOS RESIDENTES DE MANGUEZAIS

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR CAUSADA POR
Pythium aphanidermatum E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PEPINO
HIDROPÔNICO COM MICRORGANISMOS RESIDENTES DE MANGUEZAIS**

Élida Barbosa Corrêa¹; José Abrahão Haddad Galvão²

e Wagner Bettiol²

¹Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, CEP 18603-970, Botucatu, SP; ² Embrapa Meio Ambiente, SP 340 Rd., CEP 13820-000, Jaguariúna, SP.

Corrêa, E.B.; Galvão, J.A.H.; Bettiol, W. Controle biológico da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos residentes de manguezais.

RESUMO

A prospecção de agentes de controle biológico em locais similares ao de aplicação do microrganismo aumenta as chances de estabelecimento do microrganismo introduzido no ambiente. A baixa sobrevivência dos microrganismos benéficos introduzidos no ambiente hidropônico é um entrave para a utilização do controle biológico da podridão radicular em hidroponia. Devido à similaridade do ambiente hidropônico com manguezais, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de microrganismos residentes de manguezais no controle da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e na promoção de crescimento em pepino hidropônico. Dentre os 28 microrganismos avaliados para o controle da doença em mini-hidroponia utilizando plântulas de pepino, *Gordonia rubripertincta* SO-3B-2, a mistura dos isolados (*G. rubripertincta* SO-3B-2, MB-P3A-49, MB-P3-C68 e SO-3L-3 de *Pseudomonas stutzeri*) e *Bacillus cereus* AVIC-3-6 aumentaram a sobrevivência das plantas e foram posteriormente testados em condições de casa-de-vegetação em pepino hidropônico. Em condições de casa de vegetação, *B. cereus* AVIC-3-6 protegeu as plantas do subdesenvolvimento causado pelo patógeno e *G. rubripertincta* SO-3B-2 e *P. stutzeri* MB-P3A-49 promoveram o crescimento vegetal das plantas não inoculadas com o patógeno. Conclui-se que, microrganismos obtidos de manguezais são potenciais agentes de

controle biológico da podridão radicular e da promoção de crescimento de plantas em cultivos hidropônicos.

Palavras chave: controle biológico, hidroponia, podridão radicular, manguezal, *Pythium*.

ABSTRACT

BIOLOGICAL CONTROL OF ROOT ROT CAUSED BY *Pythium aphanidermatum* AND GROWTH PROMOTION IN HYDROPONIC CUCUMBER BY MEANS OF MANGROVE BACTERIA

The prospection of biological control agents in similar environments to the microbe application improves the chances of microbe establishment added to the environment. Low survival of beneficial microbes when added to hydroponic nutrient solutions sometimes limits their effectiveness for root rot control in hydroponic crops. Similarities in the osmotic environments of root zones of hydroponic systems and mangroves suggested that mangrove microbes may be well adapted to hydroponic nutrient solutions and so were investigated for controlling root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and to improve growth in hydroponic cucumbers. Among 28 strains of bacteria evaluated for controlling the disease in cucumber seedlings in small-scale hydroponic units, *Gordonia rubripertincta* SO-3B-2 alone and in combinations with *Pseudomonas stutzeri* (MB-P3A-49, MB-P3-C68 and SO-3L-3), and *Bacillus cereus* AVIC-3-6, increased the seedling survival. When these strains were subsequently evaluated in hydroponic cucumbers in a greenhouse, *B. cereus* AVIC-3-6 protected the plants from stunting caused by *Pythium aphanidermatum* and *G. rubripertincta* SO-3B-2 and *P. stutzeri* MB-P3A-49 increased the plant growth. We conclude that microorganisms from mangroves have potential value as biocontrol agents and for growth promotion in hydroponic crops.

Key words: biological control, hydroponic, root rot, mangrove, *Pythium*.

INTRODUÇÃO

O cultivo hidropônico está em plena expansão no Brasil, sendo dos segmentos do cultivo de hortaliças o que apresenta o maior crescimento (16). As razões para esse crescimento estão relacionadas com a antecipação do ciclo da cultura, elevada qualidade, homogeneidade, maior durabilidade em pós-colheita e programação da produção (39, 41, 16).

Determinadas características do sistema hidropônico, como a elevada densidade de plantas, a uniformidade genética, a baixa diversidade de microrganismos e a circulação da solução nutritiva torna esse ambiente conducente à ocorrência de epidemias de podridões radiculares. Podridões radiculares são importantes em cultivos hidropônicos no Brasil e no mundo, afetando em diferentes graus, todas as espécies cultivadas nesse sistema (28). O manejo da doença é um desafio para os produtores e técnicos, incluindo práticas de sanitização, desinfestação do sistema hidropônico e minimização dos fatores de estresse do desenvolvimento vegetal (35). Espécies de *Pythium* são os principais agentes causais de podridões radiculares em hidroponia, sendo *Pythium aphanidermatum* o mais importante (14, 35, 37). Uma vez introduzido no sistema por meio da água de irrigação, mudas, poeira, insetos e em partículas de solo aderidas às ferramentas e aos calçados (14, 35), o oomycota coloniza o sistema radicular e se dissemina rapidamente por meio da circulação da solução nutritiva para as plantas saudias, onde encontra um ambiente favorável para o seu estabelecimento (33, 41). A disseminação do patógeno ocorre principalmente por zoósporos e fragmentos de hifa, sendo a disseminação por zoósporos ativa e passiva, aumentando a sua eficiência (26). Diferentes sintomas são expressos pelas plantas como resultado do parasitismo de *Pythium* spp., como podridão radicular, subdesenvolvimento, diminuição da produção e murcha (26, 35,40).

A principal forma de controle da doença é a preventiva, principalmente por meio da utilização de água sem a presença do patógeno e de mudas saudias. Os controles genético e químico não estão disponíveis atualmente para o produtor. Uma alternativa para o manejo da podridão radicular em hidroponia é a adição, na solução nutritiva ou no substrato de cultivo, de microrganismos antagônicos ao patógeno, indutores de resistência e promotores de crescimento de plantas. O controle biológico da podridão radicular em hidroponia foi

demonstrado por Chatterton et al. (9), Khan et al. (21), Liu et al. (23), Paulitz & Bélanger, (28), Paulitz et al. (27), Utknede et al. (26), Corrêa (10) e Liu et al. (24), sendo que existem produtos registrados para o controle da doença no mercado internacional, formulados com bactérias e fungos, como o Companion[®], formulado com *Bacillus subtilis* GB03 (18), o Mycostop[®], formulado com *Streptomyces griseoviridis* (1) e o PlantShield[®], formulado com *Trichoderma harzianum* T-22 (34).

Um dos problemas encontrados na utilização do controle biológico da podridão radicular é a baixa adaptação dos agentes de biocontrole introduzidos no ambiente hidropônico (10, 21). Essa baixa adaptação pode ser explicada pela ineficiente habilidade de sobrevivência de microrganismos isolados de ambientes terrestres em hidroponia. O isolamento de microrganismos em locais similares ao ambiente hidropônico pode ser uma alternativa para aumentar a eficiência do controle biológico em hidroponia.

Manguezais são ecossistemas de transição entre ambientes terrestres, marinhos e de água doce, que compreendem 60-75% da linha costeira mundial. Países como Brasil, Indonésia e Austrália possuem as maiores áreas de manguezal do mundo (19). Esses ecossistemas são ambientes ricos em matéria orgânica e pobres em nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, indispensáveis para o crescimento vegetal. Entretanto, manguezais estão entre os mais produtivos ecossistemas. Esse paradoxo é explicado pela elevada eficiência na ciclagem de nutrientes realizada por fungos e bactérias que se mantêm com os escassos nutrientes no sistema. A diversa e altamente produtiva atividade microbiana transforma a matéria orgânica em fonte de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes utilizados pela vegetação. Em contrapartida, os exsudados radiculares servem como fonte de energia para os microrganismos que habitam o manguezal (5). Devido à elevada biomassa microbiana encontrada em manguezais, tais ecossistemas tornam-se fonte rica de isolamento de microrganismos com aplicação na agricultura e na indústria.

A prospecção de agentes de controle biológico em manguezais para utilização em hidroponia é indicada, pois os microrganismos habitantes do mangue são adaptados às concentrações e flutuações de salinidade e aos baixos teores de oxigênio, características encontradas em sistemas hidropônicos. O objetivo do trabalho foi selecionar

microrganismos residentes do manguezal para o controle da podridão radicular, causada por *P. aphanidermatum*, e a promoção de crescimento em pepino hidropônico.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos utilizados

A seleção de microrganismos capazes de controlar a podridão radicular em plântulas de pepino cultivadas em hidroponia foi realizada com actinobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo e Santa Catarina, bactérias esporogênicas isoladas do manguezal de Alagoas, fungos isolados do manguezal do Estado de São Paulo e com bactérias produtoras de biossurfactantes do manguezal de São Paulo. As bactérias esporogênicas foram isoladas no presente trabalho, e os demais microrganismos foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna/SP). Utilizou-se o isolado de *P. aphanidermatum* (SPC 1973), pertencente à coleção de culturas do Instituto de Botânica de São Paulo, oriundo de plantas de pepino.

Isolamento de bactérias esporogênicas do manguezal

Bactérias esporogênicas foram isoladas da rizosfera de plantas de *Rizophora mangle* e *Avicennia* sp., localizadas em três pontos do manguezal de Maceió, Alagoas, por meio da técnica de isolamento para *Bacillus* spp. (7). As amostras foram submetidas a 80 °C por 30 minutos. Após o tratamento térmico das amostras, essas foram diluídas em série (10^{-1} a 10^{-9}) e plaqueadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), composto por 20g de dextrose, 16g de ágar, 200 mL do caldo de batata e 800 mL de água destilada. Decorrido o período de 48 h de incubação das culturas a 25 °C, em condições de luz constante, os isolados foram purificados e preservados.

Seleção de microrganismos residentes de manguezais para o controle biológico da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) em plântulas de pepino

Com o objetivo de englobar o maior número de mecanismos de ação, que não seriam avaliados por meio de uma seleção *in vitro*, que somente favoreceria os microrganismos produtores de metabólitos secundários prejudiciais ao patógeno e os microrganismos parasitas, foi realizada a seleção *in vivo* dos isolados utilizando-se plântulas de pepino. A seleção *in vivo* foi realizada em mini-sistema hidropônico, composto por frascos de penicilina contendo solução nutritiva, acondicionados em câmara de crescimento. Para a seleção foram utilizados nove isolados de actinobactérias (8), 10 de bactérias esporogênicas (Tabela 1), cinco de fungos e quatro de bactérias produtoras de biosurfactantes (31). Os isolados de bactérias esporogênicas foram avaliados em dois experimentos (I e II), e os demais isolados foram avaliados em um único experimento para cada grupo de microrganismos.

Sementes de pepino cv. Safira (Sakata Seed América, Bragança Paulista, SP, Brasil) foram germinadas em caixas “Gerbox”, contendo papel de filtro umedecido com água destilada autoclavada. As sementes permaneceram no escuro por um dia e sob luz contínua por mais dois a três dias. Decorrido o período, as plântulas foram transferidas para frascos de penicilina contendo 15 mL de solução nutritiva preparada com água destilada autoclavada com a condutividade elétrica de 1,1 mS/cm (kit de solução nutritiva composto com macro e micronutrientes produzido pela Qualifértil – Comércio e Representações Ltda), e acondicionadas em câmara de crescimento Conviron, modelo CMP3244, com fotoperíodo de 12 h de luz a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante aproximadamente 20 dias. A iluminação da câmara de crescimento foi fornecida por quatro lâmpadas incandescentes Philips 60 W 127V e quatro lâmpadas Sylvania Cool White VHO 115W.

A multiplicação das actinobactérias foi realizada em meio Amido Caseína Agar (10 g de amido, 0,3 g de caseína, 2 g de KNO_3 , 2 g de NaCl , 2 g de K_2HPO_4 , 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g de Ágar e 1000 mL de água destilada), sendo as culturas incubadas a 25°C por sete dias, sob luz constante. Isolados de bactérias esporogênicas foram multiplicados em meio de cultura BDA por 48 h, a 25°C , sob luz constante. A multiplicação dos fungos foi realizada em meio BDA, a 25°C , sob luz

constante, durante cinco dias. Os isolados bacterianos produtores de biossurfactantes foram multiplicados em meio TSA (Tryptic-Soy-Agar) por 48 h, a 25°C, sob luz constante.

Os microrganismos residentes do manguezal foram introduzidos na solução nutritiva por meio da adição de suspensões na concentração final de 10^6 células/mL. Os tratamentos testemunha inoculada e sem inoculação não receberam as suspensões.

A produção de zoósporos de *P. aphanidermatum* foi realizada por meio da técnica adaptada de Rahimian & Banihashemi (29). *P. aphanidermatum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura V8 (100 mL de suco V8, 16 g de Agar e 2 g de CaCO_3 em 900 mL de água destilada) durante quatro dias em regime de luz contínua, a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Decorrido esse período, o meio de cultura com crescimento micelial foi cortado em tiras de aproximadamente 1 cm de largura e metade do conteúdo foi transferido para uma placa vazia. Aproximadamente 20 mL de água destilada autoclavada foi adicionado as placas de Petri, e seguiu-se a incubação das culturas em regime de luz contínua, a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante quatro dias. Após a incubação das culturas o líquido das placas foi retirado e substituído por mais 20 mL de água destilada autoclavada, após aproximadamente 4 h ocorreu a liberação dos zoósporos. Os zoósporos foram coletados e a concentração utilizada para a infestação da solução nutritiva foi ajustada por meio da agitação de uma amostra de 5 mL em Vortex e contagem em hemacitômetro.

A adição dos zoósporos de *P. aphanidermatum* na solução nutritiva foi realizada dois dias após a introdução dos microrganismos residentes do manguezal, com exceção do tratamento testemunha sem inoculação. Suspensões de 7×10^3 e 1×10^4 zoósporos/mL de *P. aphanidermatum* foram utilizadas nos ensaios I e II com bactérias esporogênicas, respectivamente; e suspensões de 4×10^3 zoósporos/mL foram utilizadas para os demais tratamentos.

A avaliação da mortalidade das plântulas foi realizada durante o transcorrer dos experimentos e a avaliação da incidência do patógeno nas raízes foi realizada no final do experimento. A incidência de *P. aphanidermatum* nas raízes foi avaliada por meio do plaqueamento de cinco fragmentos raízes, de cada repetição, em meio de cultura Ágar-Água (20 g de ágar, em 1000 mL de água destilada) acrescido dos antibióticos ampicilina

(250 mg/L) e rifampicina (10 mg/L), após a autoclavagem. Após sete dias, a incidência do patógeno foi avaliada por meio da observação de estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas de *P. aphanidermatum* em microscópio ótico.

Caracterização do isolado bacteriano

A identificação filogenética do isolado bacteriano que aumentou a sobrevivência das plântulas de pepino foi realizada por meio da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME). A análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular foi realizada através da extração dos ácidos graxos dos isolados, seguida da sua metilação, de acordo com a metodologia padrão para uso do cromatógrafo gasoso (Agilent), composto do injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID, modelo 7683) presente no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. Os programas *ChemStation A0901*[1206] e *Sherlock 4.0* foram utilizados para a identificação, sendo utilizada a biblioteca TSBA60. A identificação filogenética dos isolados foi realizada pelo índice de similaridade do perfil dos ácidos graxos dos isolados com o perfil dos ácidos graxos presente no banco de dados, sendo esse índice considerado quando superior a 0,7.

Controle biológico da podridão radicular e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos residentes de manguezais em casa de vegetação

Os isolados microbianos que se destacaram no controle biológico da doença em plântulas de pepino foram avaliados quanto a capacidade de controlar a doença e promover crescimento em pepino hidropônico em condições de casa de vegetação. Os experimentos de controle biológico e promoção de crescimento foram realizados separadamente utilizando *Bacillus cereus* AVIC-3-6, o isolado de bactéria produtora de biossurfactantes *Gordonia rubripertincta* SO-3B-2, e os isolados MB-P3A-49, MB-P3-C68 e SO-3L-3 de *Pseudomonas stutzeri*. Sementes de pepino cv. Safira foram semeadas em vasos plásticos contendo 400 mL do substrato a base de casca de pinus (Multiplant[®], Terras do Paraíso, Holambra, São Paulo, Brasil) previamente autoclavado por 1 h a 120°C. Após a emissão da folha verdadeira as plantas foram irrigadas com solução nutritiva com a condutividade elétrica de 1,5 mS/cm. O preparo da solução nutritiva foi realizado misturando-se 250 mL da solução concentrada A (1600 g de nitrato de cálcio e 150 g de Conmicros, Conplant em

10 L de água) e 250 mL da solução concentrada B (2000 g de nitrato de potássio, 400 g de fosfato monoamônio e 1200 g de sulfato de magnésio em 10 L de água) em 100L de água.

Plantas com 30 e 36 dias de desenvolvimento foram tratadas com os microrganismos residentes do manguezal, por meio da aplicação de suspensões resultando na concentração final de 1×10^6 células/mL de substrato. A inoculação do patógeno foi realizada por meio da infestação do substrato com uma suspensão na concentração final de 3×10^3 zoósporos/mL de substrato. A multiplicação dos microrganismos foi realizada conforme descrito anteriormente. Após 22 dias foram avaliadas as massas das plantas e a incidência do patógeno nas raízes.

Promoção de crescimento em pepino hidropônico com bactérias produtoras de biossurfactantes

A avaliação da promoção de crescimento em plantas de pepino por bactérias produtoras de biossurfactantes foi realizada em um experimento com o tratamento de sementes e dois experimentos (I e II) com a infestação do substrato de cultivo com os microrganismos. No experimento com o tratamento de sementes, as sementes foram lavadas em água destilada para a retirada do fungicida, e posteriormente mergulhadas em suspensão bacteriana na concentração de 1×10^6 unidades formadoras de colônia/mL por 15 minutos. Após esse período, as sementes foram acondicionadas em caixas gerbox contendo papel filtro umedecido por 12 h. Decorrido o período, as sementes foram semeadas em bandejas contendo substrato previamente autoclavado por 1 h a 120 °C. A irrigação das plantas com solução nutritiva a 1,5 mS/cm foi realizada após a emissão da folha verdadeira das plantas. Após 12 dias da semeadura foi realizada a avaliação do experimento. No experimento I, com a infestação do substrato com os microrganismos, sementes de pepino foram semeadas em vasos contendo 400 mL do substrato autoclavado por 1h a 120°C. No experimento II foram utilizados vasos com 800 mL, contendo substrato autoclavado por 1h a 120°C. A infestação da solução nutritiva no experimento I foi realizada aos 30 e 36 dias de desenvolvimento das plantas, com suspensões resultando na concentração final de 1×10^6 células/mL de substrato, sendo a avaliação do experimento realizada após 22 dias da segunda introdução dos microrganismos. No experimento II, as plantas foram infestadas com suspensões bacterianas na concentração final de 1×10^9 ufc/mL de substrato, aos sete e

13 dias de desenvolvimento as plantas. A avaliação foi realizada após 20 dias da segunda introdução dos isolados bacterianos.

A multiplicação dos isolados bacterianos no experimento I foi realizada conforme descrito anteriormente, e para o experimentos II e de tratamento de sementes foi realizada em meio de cultura TSB por 24 h na temperatura de $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob a agitação de 150 rpm, sendo a concentração ajustada por meio do uso de espectrofotômetro.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos de seleção de microrganismos residentes de manguezais para o controle da podridão radicular em câmara de crescimento foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, e os experimentos com controle biológico e promoção de crescimento em casa de vegetação foram arranjados em blocos casualizados. Nos experimentos de seleção de microrganismos foram utilizadas 10 repetições para os experimentos com actinobactérias e fungos, oito repetições para o experimento I com as bactérias esporogênicas; sete repetições para os experimentos com as bactérias esporogênicas (experimento II) e com as bactérias produtoras de biossurfactantes. Em experimentos em casa de vegetação foram utilizados quatro blocos e quatro repetições. Os dados dos experimentos foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo LSD. O pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi utilizado para a realização da análise dos experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de microrganismos residentes de manguezais para o controle biológico da podridão radicular em plântulas de pepino em mini-hidroponia

Em experimento utilizando actinobactérias para o controle da doença verificou-se sobrevivência das plântulas de pepino de 100% para os tratamentos testemunha sem inoculação com o patógeno e com o isolado *S. thermocarboxydus* MGE-7, de 90% no tratamento com os isolados *Streptomyces luridiscabiei* MSC-330, *Streptomyces* sp. 22-B e *Streptomyces arenae* R-2-17, de 80% para isolado *Streptomyces luridiscabiei* L-3-28A,

Streptomyces luridiscabiei MSC-334, *Streptomyces luridiscabiei* MSC-463 e testemunha inoculada, de 70% para o tratamento *Streptomyces* sp. A-2-3, e de 50% para o tratamento com o isolado *Streptomyces luridiscabiei* AERC-1. No entanto, os tratamentos não diferenciaram entre si, pelo teste F (Figura 1-E).

No experimento I, a sobrevivência das plântulas do tratamento testemunha sem inoculação foi de 100%, e a sobrevivência das plântulas do tratamento testemunha inoculada foi de 37,5%. A adição das bactérias esporogênicas SR1-3-2 e SR2-2-2 na solução nutritiva proporcionou sobrevivência das plântulas inoculadas com o patógeno de 75% (Figura 1-A). Os tratamentos com as bactérias AVIC-3-3, SR1-3-6, AVIC-3-9 e SR1-3-4 proporcionaram sobrevivência de 62,5% das plântulas inoculadas com *P. aphanidermatum* (Figura 1-A). Diferenças entre os tratamentos não foram encontradas pelo teste F (Figura 1-A).

No experimento II, com as bactérias esporogênicas, menor sobrevivência das plântulas foi verificada no tratamento testemunha inoculada (43%), diferindo da testemunha sem inoculação (100%) (Figura 1-B). O tratamento com o isolado AVIC-3-6 proporcionou maior sobrevivência das plântulas (71%), sendo esse isolado classificado como *B. cereus*, por meio do perfil dos ácidos graxos da membrana celular. No entanto, o tratamento com *B. cereus* AVIC-3-6 não diferiu estatisticamente da testemunha inoculada (Figura 1-B). A aplicação dos isolados SR2-3-2 e SR2-2-6 aumentou a porcentagem de mortalidade das plantas, sendo essa de 28%; e a aplicação do isolado AVIC 3-5 não apresentou efeito positivo, tendo a mesma sobrevivência da testemunha inoculada, sendo que os tratamentos não diferiram do tratamento testemunha inoculada (Figura 1-B).

Dentre os isolados de fungos testados, o L-1-3 proporcionou sobrevivência de 100% das plântulas, equivalentemente à testemunha sem inoculação. O isolado L-1-1 proporcionou sobrevivência de 90%, o L-2-7 proporcionou a sobrevivência de 80% e o R-2-4 proporcionou a sobrevivência de 70%. O tratamento com o isolado A-1-1 proporcionou a menor sobrevivência das plântulas, sendo essa de 60% (Figura 1-C). No entanto, as médias dos tratamentos não diferiram pelo teste F (Figura 1-C).

A infestação da solução nutritiva com os isolados bacterianos produtores de biossurfactantes aumentou a sobrevivência das plantas (Figura 1-D). Os tratamentos com a

bactéria *G. rubripertincta* SO-3B-2 e com a mistura de isolados mantiveram a sobrevivência das plantas em 100%, igualmente a sobrevivência da testemunha sem inoculação, diferindo estatisticamente do tratamento testemunha inoculada (Figura 1-D). Os demais tratamentos, com os isolados MB-P3A-49, MB-P3-C68 e SO-3L-3 de *Pseudomonas stutzeri*, não aumentaram a sobrevivência das plântulas (Figura 1-D).

Apesar de aumentarem a sobrevivência das plântulas, os microrganismos não diminuíram a incidência do patógeno nas raízes, sendo a sua incidência de 100% nas raízes das plântulas inoculadas (dados não mostrados). O teste de seleção de agentes de controle biológico da podridão radicular em plântulas de pepino utilizado no presente trabalho foi similar ao teste empregado por Paulitz et al. (27). Os resultados encontrados por Paulitz et al. (27) no teste com plântulas foram similares aos resultados encontrados em plantas de pepino em sistema hidropônico, sendo que o melhor isolado em testes com plântulas acondicionadas em tubos com solução nutritiva manteve a sua efetividade em promover o crescimento de plantas de pepino inoculadas com *P. aphanidermatum* em sistema hidropônico.

Controle biológico da podridão de raiz e da promoção de crescimento em pepino hidropônico dos microrganismos residentes de manguezais

A adição das bactérias produtoras de biossurfactantes não impediu o subdesenvolvimento das plantas inoculadas com o patógeno (Tabela 2). Entretanto, as plantas infestadas com a mistura de isolados obtiveram o melhor desenvolvimento quando comparado com as plantas que receberam o tratamento com *G. rubripertincta* SO-3B-2 (Tabela 2). Plantas inoculadas com o patógeno tiveram o menor desenvolvimento quando comparadas com a testemunha sem inoculação (Tabela 2). A incidência do patógeno nas raízes foi de 100% na testemunha inoculada, de 87% no tratamento com *G. rubripertincta* SO-3B-2, e de 65% no tratamento com a mistura de isolados. O patógeno não foi recuperado nas raízes das plantas do tratamento testemunha sem inoculação (Tabela 2). Apesar dos isolados bacterianos produtores de biossurfactantes não controlarem a doença no presente trabalho, a síntese de biossurfactantes pode ser listada como um importante mecanismo de controle da podridão radicular em hidroponia. Biossurfactantes são substâncias de superfície ativa, contendo composição química variada, produzidas por

fungos e bactérias, com a capacidade de lisar células sem parede celular. Essas substâncias são utilizadas para inativar zoósporos, importantes estruturas de infecção de patógenos como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. e *Plasmopara* spp. (12, 25). Nos Estados Unidos é comercializado o biofungicida de contato PRO1[®] (Jeneil Biosurfactant Company), formulado com o biossurfactante raminolípido em óleo, obtido por meio de fermentação aeróbica de *Pseudomonas aeruginosa* para o controle preventivo de míldio e podridões radiculares (12).

A adição de *B. cereus* AVIC-3-6 nas plantas inoculadas com o patógeno impediu o subdesenvolvimento do sistema radicular, causado pelo parasitismo de *P. aphanidermatum*, ocasionando um incremento de 40% na massa, em relação à testemunha inoculada (Tabela 2). Em plantas não inoculadas com o patógeno, a infestação do substrato com *B. cereus* AVIC-3-6 não promoveu o desenvolvimento das plantas (Tabela 2). A infestação da bactéria nas plantas que receberam a suspensão com zoósporos do patógeno teve a tendência de maior desenvolvimento de massa total em comparação com à testemunha inoculada (Tabela 2). A incidência do patógeno nas raízes do tratamento testemunha inoculada foi de 77%, e de 56% nas raízes das plantas que receberam *B. cereus* AVIC-3-6. O patógeno foi recuperado nas raízes do tratamento testemunha sem inoculação na porcentagem de 6%. *Pythium aphanidermatum* não foi recuperado das raízes das plantas infestadas com *B. cereus* AVIC-3-6 sem a inoculação do patógeno (Tabela 2). Em crisântemo hidropônico, a aplicação de *B. cereus* HY06 na solução nutritiva suprimiu o desenvolvimento da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* independentemente da temperatura da solução nutritiva ser alta (32°C) ou moderada (24°C), sendo um potencial agente de controle biológico da doença, assim como *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, *P. chlororaphis* TX-1, *Burkholderia gladioli* C-2-74 e *Comamonas acidovorans* OCR-7-8-38 (24). A promoção de crescimento de alface hidropônica foi verificada com a adição de *B. subtilis* BACT-O, veiculado ao bioproduto Boost[®], em plantas inoculadas com *P. aphanidermatum* (36). Os bioprodutos Companion[®] (Growth Products Ltd, EUA), Pro-Mix[®] (Premier Horticulture Inc, Canadá) e Yield Shield[®] (Bayer Crop Science, EUA) são exemplos de produtos formulados com diferentes isolados de *B. subtilis* e comercializados para o controle de podridões radiculares causadas por *Pythium* spp. (13).

Nos experimentos em casa de vegetação verificou-se elevada temperatura do ar (36 °C) e do substrato (34°C) dos vasos utilizados para o suporte das plantas (dados não mostrados). Elevadas temperaturas predispõem as plantas à podridão radicular causada por *Pythium* spp. (6, 26, 35). Em pimentão hidropônico, plantas mantidas a 28°C ou 34°C por poucas horas ou dias antes da inoculação com *P. aphanidermatum* tiveram desenvolvimento precoce da podridão radicular quando comparadas com plantas que permaneceram a 22-24°C. Maior desenvolvimento da podridão radicular foi verificado em plantas de crisântemo mantidas a 32°C, quando comparado com plantas a 20°C (35). A falha no controle da podridão radicular pelos microrganismos previamente selecionados pode ser explicada pelas elevadas temperaturas registradas na casa de vegetação (36°C), em comparação a temperatura utilizada para a seleção na câmara de crescimento (28±1°C), causando maior predisposição das plantas a doença e maior severidade da podridão radicular. A combinação de testes moleculares que utilizem primers para a detecção de genes relacionados com a produção de compostos tóxicos a *Pythium* spp. combinados com testes que comprovem a capacidade rizosférica de potenciais antagonistas a podridão radicular em plântulas cultivadas em mini-hidroponia sob elevadas temperaturas pode ser uma alternativa para o isolamento de eficientes agentes de controle biológico da doença, residentes de manguezais ou não.

Promoção de crescimento em pepino hidropônico com bactérias produtoras de biossurfactantes

Na avaliação da capacidade de promoção de crescimento de pepino hidropônico por bactérias produtoras de biossurfactantes verificou-se que o tratamento de sementes com as bactérias teve efeito neutro ou negativo sobre a altura das plântulas, sendo verificado efeito negativo com a aplicação de *P. stutzeri* SO-3L-3 (Tabela 3). Por outro lado, a introdução no substrato de cultivo de pepino hidropônico duas vezes da mistura de bactérias produtoras de biossurfactantes (1×10^6 células/mL) promoveu o desenvolvimento da massa total das plantas em 10% (Tabela 4). Em experimento com a aplicação dos mesmos isolados na concentração de 1×10^9 ufc/mL, promoção do crescimento do sistema radicular foi verificada com a aplicação de *G. rubripertincta* SO-3B-2 em 36% e de *P. stutzeri* MB-P3A-49 em 41% uma vez no substrato de desenvolvimento das plantas. Aumento na massa

total das plantas também foi verificado com a aplicação de *G. rubripertincta* SO-3B-2 uma vez no substrato de cultivo e *P. stutzeri* MB-P3A-49 aplicada uma vez ou duas no substrato, sendo os incrementos de 14%, 13% e 14%, respectivamente (Tabela 5). Em estudo realizado por Jjemba & Alexander (20), os autores verificaram que a habilidade das bactérias sobreviverem em grandes números no solo é o fator determinante do seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera.

Bactérias promotoras de crescimento de plantas pertencem a diferentes gêneros e cada espécie pode ser utilizada de forma isolada ou conjunta com outros isolados para a promoção de crescimento vegetal. Os mecanismos conhecidos de promoção de crescimento por bactérias são diversos, e compreendem a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfato, a síntese de sideróforos, a promoção da absorção de minerais, a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento, a inibição da síntese de etileno, a eliminação de microrganismos deletérios e de seus metabólitos tóxicos na zona radicular e o controle de patógenos por meio da produção de metabólitos tóxicos ao patógeno e da indução de resistência (11, 17, 22, 30).

A capacidade de microrganismos isolados de mangue promoverem o crescimento de plantas foi demonstrada por Toledo et al. (36), Bashan et al. (3), Rojas et al. (32), Bashan et al. (4) e Vazquez et al. (38). A aplicação da cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes* em plantas de mangue negro promoveu a abundante colonização radicular e aumentou a acumulação de nitrogênio nas plantas (36, 3). A utilização de uma mistura de isolados para aumentar a eficiência de controle biológico e a promoção de crescimento de plantas foi demonstrada por Rojas et al. (32) e Bashan et al. (3), onde a infestação de plântulas de mangue negro com uma mistura de dois isolados duplicou a incorporação de nitrogênio nas folhas e aumentou o seu desenvolvimento (32). O tratamento da espécie oleaginosa halófila *Salicornia bigelovi* com mistura de bactérias rizosféricas promoveu o crescimento das plantas e os conteúdos de nitrogênio e ácidos graxos nas sementes (4). Vazquez et al. (38) relataram o potencial de uso de *P. stutzeri* na promoção de crescimento de plantas utilizadas no reflorestamento em mangues áridos.

Os diferentes resultados encontrados nos experimentos de promoção de crescimento de pepino hidropônico com a aplicação da mistura de isolados na concentração de 1×10^6

células/mL (Tabela 4) e da não promoção de crescimento na concentração de 1×10^9 ufc/mL (Tabela 5), pode ser explicada pelas diferentes concentrações de inóculo, que podem ter causado diferentes colonizações radiculares. De acordo com Weller & Zablotowicz (1987) e Howel & Okon (1987), citados por Freitas (15), a inconsistência dos resultados de promoção de crescimento por rizobactérias é responsável pela colonização radicular variável, ocasionada, por problemas de sobrevivência do inóculo. A aplicação da mistura de isolados na concentração de 1×10^9 ufc/mL pode ter causado a competição entre os isolados, ocasionando a falha na promoção de crescimento, sendo esse problema possivelmente não encontrado quando se utilizou concentração inferior de inóculo (1×10^6 células/mL).

Microrganismos isolados de manguezais são promissores agentes de controle biológico da podridão radicular e promotores de crescimento de plantas, em cultivos hidropônicos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AGBIO. Mycostop[®]. Disponível em: <http://www.agbio-inc.com/Mycostop.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2007.
3. BASHAN, Y; PUENTE, ME; MYROLD, D.D, TOLEDO G. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p.165-170,1998.
4. BASHAN Y, MORENO M, TROYO E. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, p.265-272, 2000.
5. BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, Berlin, v.16, p.159-166, 2002.
6. BATES, M.L.; STANGUPELLINI, M.E. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.11, p. 989-991, 1984.

7. BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In. MELO, I.S. de, SANHUEZA, R.M.V. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995.p.35-36. (Manual técnico).
8. CANOVA, S.P. Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 66 p., 2009.
9. CHATTERTON, S.; SUTTON, J.C.; BOLAND, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hidroponic peppers. **Biological Control**, San Diego, v.30, p.360-373, 2004.
10. CORRÊA, E.B. **Controle da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica**. Dissertação mestrado, Lavras, UFLA, 93p. 2006.
11. DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, Amsterdam, v.69, p.365-373, 1982.
12. DE JONGHE, K.; DE DOBBELAERE, I.; SARRAZYN, R., HÖFTE, M. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. **Plant Pathology**, St Paul, v. 54, p. 219-226, 2005.
13. EPA - United States Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/product_lists/new_ai_2007.htm, acesso em 22 de março de 2009.
14. FAVRIN, R.J.; RAHE, J.E.; MAUZA, B. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumbers in British Columbia greenhouses. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.8, p.683-687, 1988.
15. FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. p.1-20. In. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Eds. SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S.S. Campinas, 2007.
16. FURLANI, P.R. Simpósio IV – *Pythium* em sistemas hidropônicos – danos e perspectivas para o controle: Principais sistemas hidropônicos em operação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p.146-147, 2008.

17. GLICK BR, BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, p.353-378, 1997.
18. GROWTH PRODUCTS. Disponível em:
<http://www.growthproducts.com/pages/horticulture.asp?tables=featured&product=10>,
acesso em 25 de março de 2009. NEW BIOPRODUCTS –
http://newbioproducts.net/index_files/Page797.htm, acesso em 02 de abril de 2009.
19. HOLGUIN, G.; BASHAN, Y.; MENDOZA-SALGADO, R.; AMADOR, E.; TOLEDO, G.; VÁZQUEZ, P.; AMADOR, A. La microbiología de los mangrales. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. **Ciencia y Desarrollo**, Mexico, p.26-35, 1999.
20. JJEMBA, P. K. & ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 31, n. 4, p. 623-632, 1999.
21. KHAN, A. SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, p. 615-630, 2003.
22. KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.11, p.1078-1082, 1980.
23. LIU, W.; SUTTON, J.C.; KHAN, A.; GRODZINSKI, B. Effectiveness of five bacterial agents against root diseases caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum* in hydroponic chrysanthemum. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.24, p.377, 2002.
24. LIU, W.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 35, p. 159-178, 2007.
25. NIELSEN, C.J.; FERRIN, D.M.; STANGHELLINI, M.E. Efficacy of biosurfactants in the management of *Phytophthora capsici* on pepper in recirculating hydroponic systems. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, n.3, p. 450-460, 2006.
26. OWEN-GOING, T.N.; SUTTON, J.C; GRODZINSKI. Relationship of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.25, p.155-167, 2003.

27. PAULITZ, T.C.; ZHOU, T. & RANKIN, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. **Biological Control**, San Diego, v.2, p. 226-237. 1992.
28. PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.
29. RAHIMIAN, M.K.; BANIHASHEMI, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucumber seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 63, p.658-661, 1979.
30. RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAN, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v.20, p. 1-11, 2001.
31. REYES, L.F. **Diversidade de bactérias em manguezal e biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos**. Tese apresentada à Universidade de São Paulo(USP), São Paulo, SP, 123 p., 2009.
32. ROJAS A, HOLGUIN G, GLICK BR, BASHAN Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P -solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.35, p.181-187, 2001.
33. STANGHELLINI, M.E. et al. Root rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore-producing isolates of *Pythium intermedium*. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.4, p.358-359, 1988.
34. STEWART, A. Commercial biocontrol – reality or fantasy? **Australasian Plant Pathology**, Perth, v.30, p. 127-131, 2001.
35. SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOING, T.N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J.C. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 32, p. 307-321, 2006.
36. TOLEDO G, BASHAN Y, SOELDNER A. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.999-1011, 1995.

37. UTKHEDE, R.S.; LÉVESQUE, C.A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 22, p. 138-144, 2000.
38. VAZQUEZ P, HOLGUIN G, PUENTE ME, LOPEZ-CORTES A, BASHAN Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p.460-468, 2000.
39. YAÑEZ, L.D.T. **Identificação, patogenicidade e controle químico de espécies de *Pythium* na cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.)**. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 74 p., 2000.
40. ZHENG, J.; SUTTON, J.C.; YU, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, n.4, p.368-379, 2000.
41. ZINNEN, T.M. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n. 2, p. 96-99, 1988.

Tabela 1. Isolado bacteriano, planta hospedeira e diluição utilizada para o isolamento de bactérias esporogênicas residentes do manguezal de Maceió, Alagoas.

Isolado	Planta	Diluição
AVIC-3-3	<i>Avicennia</i> sp.	10^{-3}
AVIC-3-5	<i>Avicennia</i> sp.	10^{-5}
AVIC-3-6	<i>Avicennia</i> sp.	10^{-6}
AVIC-3-8	<i>Avicennia</i> sp.	10^{-8}
AVIC-3-9	<i>Avicennia</i> sp.	10^{-9}
SR1-3-2	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-2}
SR1-3-4	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-4}
SR1-3-6	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-6}
SR2-2-2	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-2}
SR2-2-6	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-6}
SR2-2-5	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-5}
SR2-3-2	<i>Rizophora mangle</i>	10^{-2}

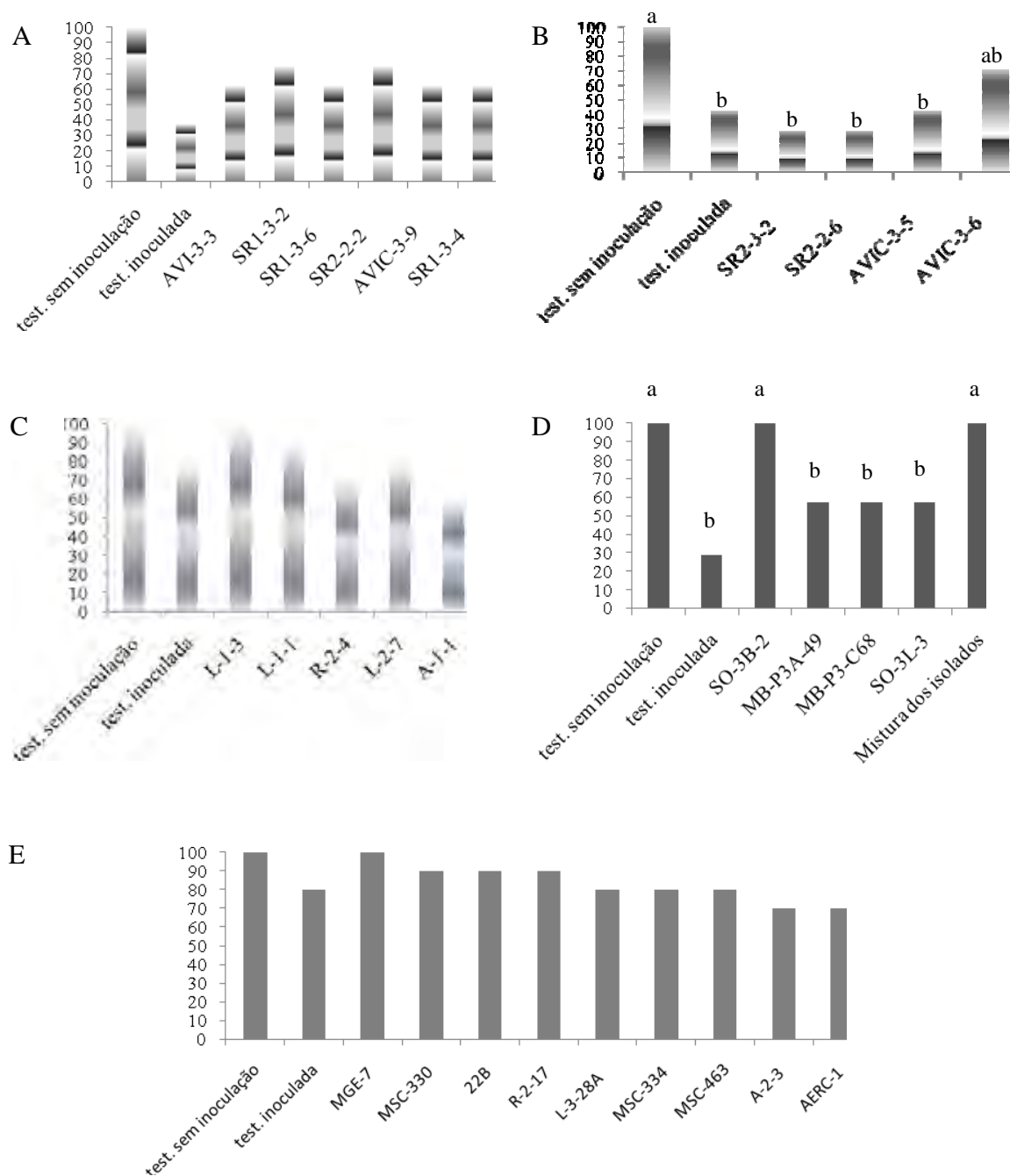


Figura 1. Sobrevivência de plântulas de pepino após a introdução na solução nutritiva de microrganismos residentes de manguezal (A-E) e infestação com *Pythium aphanidermatum*. (A-B) infestação com bactérias esporogênicas; (C) infestação com fungos; (D) infestação com as bactérias produtoras de biossurfactantes; (E) infestação com actinobactérias. As médias dos gráficos sem letra não diferem pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste LSD, a 5%.

Tabela 2. Efeito da introdução de microrganismos residentes de manguezais no substrato de cultivo hidropônico de plantas de pepino, aos seis e um dia antes da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa seca das plantas e a incidência do patógeno nas raízes, aos 22 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamentos	Massa seca sistema aéreo	Massa seca sistema radicular	Massa seca total	Incidência (%) de <i>Pythium aphanidermatum</i>
<i>Bactérias produtoras de biossurfactantes</i>				
Testemunha sem inoculação	8,39 ⁽¹⁾	0,92	9,76 a ⁽²⁾	-
<i>Gordonia rubripertincta</i> SO-3B-2 + <i>P. aphanidermatum</i>	8,05	0,75	8,79 b	87
Mistura de isolados + <i>P. aphanidermatum</i>	8,51	0,82	9,33 ab	65
Testemunha inoculada	7,93	0,67	8,90 b	100
<i>Bacillus cereus</i> AVIC-3-6				
Testemunha sem inoculação	8,62 a	0,64 ab	9,11 a	6 b
<i>Bacillus cereus</i>	7,62 b	0,80 a	8,23 ab	-
<i>Bacillus cereus</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	8,10 ab	0,66 a	8,53 ab	56 a
Testemunha inoculada	7,50 b	0,47 b	7,82 b	77 a

⁽¹⁾Dados sem letra não foram significativos pelo teste F. ⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

Tabela 3. Efeito do tratamento de sementes de pepino com bactérias produtoras de biossurfactantes, aos 12 dias após a semeadura, sobre a altura e massa seca das plantas.

Tratamentos	Altura (cm)	Massa seca aerea (g)	Massa seca radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha sem infestação	162,58 a ⁽¹⁾	0,23 ⁽²⁾	0,040 a	0,27
<i>Gordonia rubripertincta</i> SO-3B-2	160,67 a	0,23	0,036 a	0,27
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3A-49	157,30 a	0,20	0,040 a	0,24
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3-C68	156,56 ab	0,24	0,042 a	0,28
<i>Pseudomonas stutzeri</i> SO-3L-3	143,04 b	0,23	0,042 a	0,27
Mix do isolados	153,60 ab	0,21	0,038 a	0,25

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ⁽²⁾ Médias sem letra não foram significativos pelo teste F.

Tabela 4. Efeito da introdução de bactérias produtoras de biossurfactantes (*Gordonia rubripertincta* SO-3B-2 e *Pseudomonas stutzeri* MB-P3A-49, MB-P3-C68 e SO-3L-3), no substrato de cultivo hidropônico de pepino, aos 30 e 36 dias após a semeadura das plantas, aos 22 dias após a segunda infestação do substrato com os microrganismos, sobre a massa seca das plantas.

Tratamentos	Massa seca aérea	Massa seca radicular	Massa seca total
Testemunha sem infestação	7,75 ab ⁽¹⁾	0,54 ⁽²⁾	8,29 b
<i>Gordonia rubripertincta</i> SO-3B-2	7,42 b	0,64	8,07 b
Mistura de isolados	8,44 a	0,70	9,14 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ⁽²⁾ Dados sem letra não foram significativos pelo teste F.

Tabela 5. Efeito da introdução de bactérias produtoras de biossurfactantes no substrato de cultivo de pepino hidropônico, aos 20 dias após a segunda infestação do substrato com os microrganismos sobre a massa seca das plantas.

Tratamento	Massa seca aerea (g)	Massa seca radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha sem infestação	13,20 ab ⁽¹⁾	7,48 cd	20,78 ab
Uma aplicação dos microrganismos			
<i>Gordonia rubripertincta</i> SO-3B-2	13,40 ab	10,20 ab	23,60 a
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3A-49	12,83 ab	10,59 a	23,42 a
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3-C68	13,55 ab	8,23 abcd	21,78 ab
<i>Pseudomonas stutzeri</i> SO-3L-3	12,23 ab	9 abcd	21,25 ab
Mistura do isolados	12,86 ab	8,74 abcd	21,60 ab
Duas aplicações dos microrganismos			
<i>Gordonia rubripertincta</i> SO-3B-2	11,73 ab	8,44 abcd	20,16 ab
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3A-49	13,75 a	9,87 abc	23,61 a
<i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-P3-C68	11,98 ab	7,94 bcd	19,92 ab
<i>Pseudomonas stutzeri</i> SO-3L-3	12,86 ab	8,11 abcd	20,97 ab
Mistura do isolados	11,40 b	6,83 d	18,23 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DE *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 E *Bacillus subtilis* GB03 SOBRE A
PODRIDÃO RADICULAR CAUSADA POR *Pythium aphanidermatum* E O
DESENVOLVIMENTO DE PIMENTÃO HIDROPÔNICO**

Efeito de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 sobre a podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e o desenvolvimento de pimentão hidropônico

Elida B. Correa¹, John Sutton e Wagner Bettiol

Resumo: Podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* são um sério problema para o cultivo de pimentão hidropônico em todo o mundo. Cultivares resistentes não estão disponíveis para o produtor e não existem fungicidas registrados para o uso em hidroponia. A principal medida de controle da doença é o impedimento da entrada do patógeno no sistema. Uma vez instalado no sistema hidropônico, a sua supressão pode ser realizada por meio da adição de agentes de controle biológico na solução nutritiva. Além de controlarem a doença, os microrganismos benéficos podem promover o crescimento das plantas, aumentando a receita do produtor. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 sobre a podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico. O melhor efeito na supressão dos danos causados pela doença e na promoção de crescimento vegetal foi verificado com duas aplicações de *P. chlororaphis* 63-28 e com três de *B. subtilis* GB03 na solução nutritiva. Conclui-se que, a utilização dos agentes de biocontrole *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 tem potencial para suprimir os danos causados pela podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* em pimentão hidropônico.

Palavras chave: podridão radicular, *Pythium aphanidermatum*, controle biológico, pimentão hidropônico.

Effect of the *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 on root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and plant growth in hydroponic pepper

Abstract: Root rot caused by *Pythium* species is a serious problem in hydroponically grown peppers worldwide. Resistant pepper varieties are not available and no fungicides are registered for use in hydroponic crops. Preventive methods are the main means available for controlling the disease. After onset, disease can be suppressed through the application of biocontrol agents to the nutrient solution. Besides disease control, beneficial microbes may also promote plant growth, and thus potentially increase crop profitability. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 against root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and for growth promotion in hydroponic peppers when applied into the nutrient solutions at different times during crop development. The most effective treatments tested were twice applications of *P. chlororaphis* 63-28 and *B. subtilis* GB03 applied three times to the nutrient solution. We conclude that when appropriately timed *P. chlororaphis* 63-28 and *B. subtilis* GB03 are useful tools for suppressing root rot caused by *P. aphanidermatum* in hydroponic pepper.

Key words: root rot, *Pythium aphanidermatum*, biological control, hydroponic pepper.

E.B. Corrêa.¹ Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP, Department of Plant Protection, Km 3 Alcides Soares Rd., Botucatu, SP, 18610-307, Brazil.

J.C. Sutton. University of Guelph, Department of Environmental Biology, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

W. Bettiol. Embrapa Meio Ambiente, SP 340 Rd., Jaguariúna, SP, 13820-000, Brazil ¹
Autor para a correspondência (e-mail: elidabcorrea@yahoo.com.br).

Introdução

Importante membro da família Solanácea, o pimentão (*Capsicum annum* L.) é uma das cinco hortaliças de maior consumo no Brasil e no mundo, sendo consumido de forma *in natura* ou desidratado (Oliveira e Luz, 1998; Pernezny et al. 2003). A produção comercial de pimentão, hidropônica ou não, é dependente do eficiente controle de pragas e doenças, devido ao fato da cultura ser hospedeira de diversos parasitas, incluindo oomycotas, fungos, bactérias, vírus, fitoplasmas e nematóides (Pernezny et al. 2003). Podridões radiculares são as principais doenças que incidem sobre cultivos hidropônicos, podendo causar desde perdas na produção até a morte das plantas. Dentre os agentes causais de podridões radiculares em hidroponia, o oomycota, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., destaca-se como um dos mais destrutivos (Bates e Stanghellini, 1984; Owen-Going, 2003; Stanghellini e Kronland, 1986; Zheng et al. 2000). Os sintomas da doença incluem o subdesenvolvimento das plantas e a diminuição da produção de frutos, além do sintoma clássico de podridão radicular. Em condições de elevada severidade da doença, acompanhadas por elevadas temperaturas do ar e da solução nutritiva, sintomas de murcha podem ocorrer, seguidos da morte das plantas em poucos dias (Owen-Going, 2002; Huang e Jarvis, 2002).

O controle da podridão radicular em sistemas hidropônicos não é uma medida simples. Produtores não podem fazer o uso das práticas clássicas de controle de doenças de plantas como cultivares resistentes e de fungicidas. Cultivares resistentes à doença ainda não estão disponíveis no mercado e não existem fungicidas registrados para a utilização em hidroponia no Brasil. Diante da severidade da doença e do alto valor comercial da cultura é imprescindível a utilização de medidas preventivas de controle. O controle preventivo pode ser realizado principalmente por meio da utilização de água e de substratos isentos de propágulos do patógeno e de sementes e mudas sadias (Sutton et al. 2006). Radiação ultravioleta, filtração e elevadas temperaturas podem ser utilizadas para a desinfestação da solução nutritiva. No entanto, essas medidas não afetam a população do patógeno presente no sistema radicular, tendo a sua eficiência limitada (Sutton et al. 2006; Paulitz e Bélanger, 2001).

A manipulação pelo homem de processos que ocorrem naturalmente como a antibiose entre os microrganismos e a capacidade de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias vem sendo utilizada como uma alternativa para controlar a podridão radicular e promover o crescimento de plantas cultivadas em hidroponia (Bochow, 1992; Sutton et al. 2006; Paulitz et al. 1992; Zheng et al. 2000; Postma et al. 2000; Chatterton et al. 2004; Nemeč et al. 1996; Corrêa et al. 2005; Liu et al. 2007). Dentre os microrganismos estudados para o controle biológico da podridão de raiz, bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. destacam-se quanto a efetividade de controle da doença em hidroponia (Rankin e Paulitz, 1994; McCullagh et al. 2006; Liu et al. 2003; Utkhede et al. 2000). *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 é reportada como eficiente agente de controle biológico da podridão de raiz em hidroponia nas culturas do pimentão, pepino, boca-de-leão e crisântemo (Liu et al. 2007; Liu et al. 2002; Owen-Going et al. 2003). Além de eficiente agente de biocontrole da doença em hidroponia, *P. chlororaphis* 63-28 atua como promotor de crescimento vegetal (Liu et al. 2003; Gagné et al. 1993; EPA, 2009). Os mecanismos de ação de *P. chlororaphis* 63-28 incluem a produção do antibiótico fenazina, de hormônios de crescimento vegetal, além da competição por sítios de colonização com o patógeno (EPA, 2009; Zheng et al. 2000; Chatterton et al. 2004). *Bacillus subtilis* GB03 é o ingrediente ativo do produto comercial Companion[®], comercializado para controle biológico de doenças de plantas em hidroponia e também em outros tipos de cultivos nos Estados Unidos (Growth Products, 2009). Os mecanismos de ação de *B. subtilis* GB03 são a indução de resistência, o aumento na absorção de nutrientes, a antibiose, a competição por nutrientes e espaço e a promoção de crescimento (EPA, 2009; Growth Products, 2009).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) na solução nutritiva de cultivo de pimentão hidropônico sobre o progresso da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e o desenvolvimento vegetal.

Material e Métodos

O efeito de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) sobre a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e o desenvolvimento de pimentão hidropônico foi avaliado em quatro experimentos, sendo: (I) avaliação de *P. chlororaphis* 63-28 sobre a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e o desenvolvimento de pimentão hidropônico; (II, III e IV) avaliação de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) sobre a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e o desenvolvimento de pimentão hidropônico, modificando-se o número de aplicações dos agentes de biocontrole, sendo duas aplicações dos agentes de biocontrole utilizadas no experimento II; três aplicações utilizadas no experimento III; e duas aplicações de *P. chlororaphis* 63-28 e três de *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) utilizados no experimento IV.

Cultivo de pimentão hidropônico

Sementes de pimentão cv. 35-206 RZ (RIJK ZWAAN Ind., Holanda) foram germinadas em cubos de lã de rocha (2,5 cm x 2,5 cm x 4,0 cm, Grodan, Roermond, Holanda) sobre bandejas de plástico e acondicionadas em câmara de crescimento. As plântulas foram irrigadas com água deionizada por 22 dias e após esse período foram transferidas para cestas plásticas de 5 cm de diâmetro (Homegrown Hydroponics, Breslau, ON) e irrigadas com a metade da concentração da solução nutritiva por 11 dias. Assim, plântulas com a idade de 33 dias foram transferidas para as unidades hidropônicas.

As unidades hidropônicas utilizadas nos experimentos foram constituídas de recipientes de polietileno branco com a capacidade para 475 mL de solução nutritiva. Para se excluir a luz, a tampa foi coberta com um plástico dupla face (preto-branco). A preparação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se 0,73 g do fertilizante solúvel 7:11:27 (NPK + micronutrientes: Plant Products Ltd., Brampton, ON, Canadá) e 0,48g Ca(NO₃)₂ por litro de água deionizada, e o pH foi ajustado para 5,8 e mensurado com um medidor de pH portátil (Accumet model AP61, Fisher Scientific, Toronto, Canadá). A solução nutritiva (1,4 mS cm) em cada unidade foi continuamente aerada por bombas de aquário com tubos de plástico (2 mm de diâmetro interno) e reposta quando necessário. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com o fotoperíodo de 16 h de luz,

fornecidas por lâmpadas fluorescentes (115 W Branco Frio; GTE, Sylvania Ltd, Canadá). A umidade relativa do ar foi de 75% durante a condução dos experimentos. A temperatura da câmara de crescimento para o experimento I variou de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (dia) a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (noite) durante os primeiros 46 dias; de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (dia) a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (noite) durante os subsequentes sete dias e novamente ajustada para $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (dia) a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (noite) durante 14 dias. Diferentes temperaturas foram utilizadas no experimento I devido à falta de disponibilidade de câmaras de crescimento. Nos experimentos II, III e IV a temperatura da câmara de crescimento foi de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (dia) a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (noite).

As avaliações destrutivas das plantas foram realizadas no experimento I após 67 dias, no II após 79 dias, no III após 70 dias e no IV após 74 dias de cultivo.

Produção do inóculo de *Pseudomonas chlororaphis*

A produção do inóculo de *P. chlororaphis* isolado 63-28 (Turf Science Laboratories Inc., National City, CA, EUA) foi realizada em meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) por 48 h a 150 rpm em agitador a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, após esse período, o meio de cultura foi centrifugado por 15 min., a 2000 g para a separação das células bacterianas. As células recuperadas foram lavadas duas vezes utilizando-se tampão 0,1 M MgSO_4 por meio da centrifugação a 2000 g por 10 minutos. A concentração da bactéria foi estimada por meio do plaqueamento da suspensão em TSA.

Aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®) na solução nutritiva

A concentração final de *P. chlororaphis* 63-28 na solução nutritiva foi de 1×10^7 ufc/mL e de *B. subtilis* GB03 (Companion®) (Growth Products, White Plains, NY, EUA) foi de 5×10^4 ufc/mL para a primeira aplicação e de 3×10^4 ufc/mL para a segunda e a terceira aplicação, sendo utilizada a dose recomendada pelo fabricante de 260 mL por 1000 L de solução nutritiva para a primeira aplicação, e de 156 mL para a segunda e a terceira aplicação.

No experimento I a aplicação na solução nutritiva de *P. chlororaphis* 63-28 foi realizada sete dias antes da inoculação do patógeno. A introdução na solução nutritiva de

P.chlororaphis 63-28 e *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) no experimento II foi realizada sete dias antes das raízes serem inoculadas com *P. aphanidermatum* e no dia da inoculação com o patógeno. A aplicação dos agentes de biocontrole no experimento III foi realizada sete dias antes das raízes serem inoculadas com *P. aphanidermatum*, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação das plantas. No experimento IV, *P.chlororaphis* 63-28 foi aplicada sete dias antes das raízes serem inoculadas com *P. aphanidermatum* e no dia da inoculação com o patógeno; *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) foi aplicado sete dias antes das raízes serem inoculadas com *P. aphanidermatum*, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação das plantas.

Produção do inóculo de *Pythium aphanidermatum* e inoculação das plantas

A produção de zoósporos do isolado de *P. aphanidermatum* P6 foi realizada por meio da técnica adaptada de Rahimian e Banihashemi (1979). O oomycota foi cultivado em meio de cultura V8 (10% de suco de V8) em placas de Petri por 48 h a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, metade do conteúdo do meio de cultura com o crescimento do patógeno foi transferido para outra placa, onde foram adicionados aproximadamente 20 mL de água deionizada esterilizada. As culturas foram incubadas novamente por 96 h, quando houve nova troca de água. Após a segunda troca de água, as culturas foram incubadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, e após 4-5 h os zoósporos foram liberados. Os zoósporos liberados foram coletados, sendo a suspensão ajustada para 5×10^3 zoósporos/mL, para a inoculação das plantas. A concentração de zoósporos na suspensão foi estimada por meio da vibração de 5 mL das amostras em microtubos em Vortex (Fisher Scientific, Toronto, Ontário, Canadá) por 30 seg., realizando-se a contagem dos zoósporos em hemacitômetro.

A inoculação das plantas em estágio de floração foi realizada posicionando-se cada planta em um becker com o sistema radicular totalmente imerso na suspensão de zoósporos por 30 min., e imediatamente retornados para a sua unidade hidropônica. As raízes das plantas sem a inoculação com o patógeno foram imersas na solução nutritiva com a metade da concentração de sais. No experimento IV, a inoculação das raízes foi realizada em 30% do volume radicular.

Avaliação da incidência do patógeno nas raízes e da severidade da podridão de raiz

A avaliação da incidência do patógeno foi realizada por meio do plaqueamento de amostras de raízes retiradas randomicamente das plantas no final do experimento. Cinco segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento por planta foram plaqueados em meio P5AR (20 g de Corn Meal Ágar, 1000 mL de água deionizada, acrescidos de 250 mg/L de ampicilina e 10 mg/L de rifampicina após a autoclavagem) e incubados a 28°C por 48 h. Após esse período, a incidência de *P. aphanidermatum* nas raízes foi avaliada por meio da observação de estruturas de reprodução sexuadas e assexuadas do patógeno presentes no meio de cultura, em microscópio. Para a estimativa da severidade, por meio do escurecimento radicular, cada planta foi mantida acima da solução nutritiva e o seu sistema radicular foi examinado por aproximadamente 10 seg. A porcentagem das raízes descoloridas foi estimada utilizando-se uma escala de 0 – 10 (0=0%, 1=1-10%, 2=11-20%,...10=91-100%). Os valores médios da escala foram utilizados para se realizar as análises. O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença foi realizado por meio da fórmula descrita por Shaner e Finney (1987).

Análises do desenvolvimento das plantas

A avaliação da expansão da área foliar foi realizada de forma não destrutiva, marcando-se uma folha jovem expandida (5 a 20 cm²) por repetição de cada tratamento e realizando-se o desenho dessa mesma folha em transparência durante o período após a inoculação das plantas com o patógeno, em dias alternados. No final do experimento realizou-se a conversão da massa do desenho da folha em área foliar por meio da pesagem de um cm² da transparência utilizada no desenho das folhas. A taxa de crescimento foliar foi calculada pela fórmula: $TXCF = \frac{C_{n+1} - C_n}{T_{n+1} - T_n}$, onde C é o valor de crescimento foliar, n é o dia da avaliação e T é o tempo em que a avaliação do crescimento foi realizada. O cálculo da área abaixo da curva de crescimento das folhas e da área abaixo da taxa do crescimento foliar foi realizado por meio da fórmula descrita por Shaner e Finney (1987). O conteúdo de clorofila nas folhas foi avaliado no final do experimento com o equipamento Chlorophyll Meter Minolta SPAD-502, realizando-se a média do pigmento em quatro quadrantes por folha, sendo avaliadas cinco folhas por repetição. A altura de cada planta foi medida a partir dos cubos de lã de rocha até o ponto mais elevado das plantas. Nas análises

destrutivas, o sistema aéreo foi separado do sistema radicular, determinando-se a massa fresca. Todas as raízes do exterior da lâ de rocha foram removidas, retirando-se o excesso de água, para se determinar a massa fresca. Para a medida de massa seca, o sistema aéreo e o radicular foram secos a 80°C por 48 h em estufa de secagem. A massa total das plantas foi obtida por meio da soma da massa do sistema aéreo (folhas e caule) com a massa do sistema radicular. A relação entre a massa do sistema aéreo das plantas pela massa do sistema radicular foi obtida pela divisão do sistema aéreo (folhas e caule) pelo sistema radicular.

Análises estatísticas

Para a análise dos resultados foi utilizado o pacote estatísticos SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de LSD. O experimento I foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento e os experimentos II, III e IV foram arranjados em cinco blocos inteiramente casualizados.

Resultados

Experimento I. Efeito da aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 sete dias antes da inoculação com *Pythium aphanidermatum* sobre a podridão radicular e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico.

O tratamento com a inoculação do patógeno sem a presença de *P. chlororaphis* 63-28 apresentou o maior progresso da doença quando comparado com o tratamento onde a bactéria foi introduzida na solução nutritiva sete dias antes da inoculação do patógeno. *P. chlororaphis* 63-28 reduziu o progresso da doença entre 50-60% durante 8 a 11 dias após a inoculação com *P. aphanidermatum* (Figura 1). *Pythium aphanidermatum* foi recuperado em todas as raízes das plantas em que foi inoculado, mas não foi recuperado nas raízes das testemunhas tratadas ou não com *P. chlororaphis* 63-28 (dados não mostrados). Escurecimento radicular ou podridão das raízes não foram verificados nos tratamentos onde o patógeno não foi aplicado (Figura 1). Apesar das diferenças entre as curvas dos

tratamentos, os valores da área abaixo da curva de progresso da doença não foram significativos pelo teste F (Tabela 1).

Não foram verificadas diferenças com relação à expansão foliar entre os tratamentos com ou sem a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28, nas plantas com ou sem inoculação com *P. aphanidermatum* (Figura 2). Os valores da área abaixo da curva de crescimento foliar não diferiram pelo teste F (Tabela 1).

O patógeno diminuiu o conteúdo de clorofila nas folhas das plantas de pimentão aos 11 dias após a sua inoculação. A testemunha teve o maior conteúdo de clorofila nas folhas, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com a adição de *P. chlororaphis* 63-28 na presença ou na ausência do patógeno (Figura 3). A massa seca das plantas de pimentão não diferiu entre os tratamentos pelo teste F (Tabela 2).

Experimento II. Efeito da aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 sete dias antes e no dia da inoculação de *Pythium aphanidermatum* sobre a podridão radicular e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico

Plantas tratadas com *B. subtilis* GB03 e inoculadas com o patógeno apresentaram o menor progresso da doença quando comparadas com as plantas da testemunha inoculada ou com as que foram tratadas com *P. chlororaphis* 63-28 e inoculadas com o patógeno. A redução na curva de progresso da doença foi de 70% a 50% entre o 5º e 8º dias após a inoculação e 37% a 19%, entre o 9º e o 13º dias após a inoculação (Figura 4). A incidência de *P. aphanidermatum* foi de 100% nas plantas em que o patógeno foi inoculado. O patógeno não foi recuperado das raízes de plantas não inoculadas (dados não mostrados). Sintomas de podridão de raízes não foram verificados em plantas dos tratamentos sem a inoculação das raízes com zoósporos do patógeno (Figura 4). Os valores da área abaixo da curva de progresso da doença não foram significativos pelo teste F (Tabela 3).

Maior tendência de expansão foliar das plantas do tratamento com *P. chlororaphis* 63-28 sem a inoculação com o patógeno foi verificada (Figura 5). A aplicação de *B. subtilis* GB03 na solução nutritiva sem a inoculação do patógeno não promoveu a expansão foliar, sendo essa inferior a expansão foliar do tratamento testemunha sem a inoculação (Figura 5). Em plantas inoculadas com *P. aphanidermatum*, *P. chlororaphis* 63-28 proporcionou

maior tendência de curva de crescimento foliar (Figura 5). *B. subtilis* GB03 não alterou o crescimento foliar em plantas inoculadas com o patógeno (Figura 5). Maior área abaixo da curva de crescimento foliar foi verificada no tratamento com a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 sem a inoculação do patógeno. Entretanto, esse valor não diferiu estatisticamente do tratamento testemunha e *B. subtilis* GB03 sem a inoculação do patógeno (Tabela 3). A inoculação das plantas com *P. aphanidermatum* diminuiu a área abaixo da curva de crescimento foliar das plantas e a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 teve efeito positivo nas plantas inoculadas com o patógeno (Tabela 3).

A taxa de crescimento foliar das plantas do tratamento testemunha sem inoculação do patógeno ou sem a introdução dos agentes de biocontrole foi inferior à taxa de crescimento das plantas do tratamento com *P. chlororaphis* 63-28 sem a inoculação do patógeno, sendo esse tratamento superior aos demais (Figura 6). *B. subtilis* GB03 aplicado na solução nutritiva das plantas não inoculadas não promoveu a taxa de crescimento foliar, sendo essa inferior a sua testemunha (Figura 6). Nos tratamentos com a inoculação do patógeno, maior taxa de crescimento foliar foi verificada quando os agentes de biocontrole foram aplicados na solução nutritiva, sendo que a de *P. chlororaphis* 63-28 promoveu a maior taxa de expansão foliar quando comparada com a de *B. subtilis* GB03 (Figura 6). As plantas inoculadas com o patógeno tiveram a menor taxa de crescimento foliar, sendo essa decrescente com a evolução do tempo (Figura 6). A inoculação das plantas com *P. aphanidermatum* diminuiu a área abaixo da taxa de crescimento foliar das plantas (Tabela 3). Diferenças estatísticas não foram encontradas entre as áreas abaixo da taxa de crescimento das plantas não inoculadas e inoculadas (Tabela 3). No entanto, efeito positivo foi verificado com a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 (Tabela 3).

As plantas não inoculadas com o patógeno apresentaram maior teor clorofiliano e altura, independentemente da aplicação das bactérias utilizadas no biocontrole da doença, quanto comparadas aos tratamentos que receberam a inoculação (Tabela 4).

A aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 incrementou a produção em relação à testemunha sem a adição da bactéria em 36,6%, diferindo-se estatisticamente desta (Figura 7). Efeito positivo também foi verificado com a adição de *B. subtilis* GB03, com o aumento de 11,7% na massa dos frutos em relação à testemunha (Figura 7). Os valores da

massa dos frutos dos tratamentos com *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 inoculados com o patógeno não diferiram estatisticamente em relação à testemunha não inoculada com o patógeno (Figura 7). A inoculação das plantas de pimentão com *P. aphanidermatum* causou a diminuição de 28% em relação à massa dos frutos da testemunha sem a inoculação do patógeno (Figura 7).

As plantas não inoculadas com o patógeno apresentaram maior massa fresca do que as plantas inoculadas (Tabela 5). A aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 não protegeu as plantas do subdesenvolvimento ocasionado pelo parasitismo de *P. aphanidermatum* (Tabela 5). A relação entre o sistema aéreo e o sistema radicular não diferiram pelo teste F (Tabela 5). Plantas inoculadas com o patógeno sem a adição das bactérias tiveram o menor desenvolvimento e não foram encontradas diferenças relacionadas à adição ou não dos bioagentes nas plantas não inoculadas com o patógeno (Tabela 5).

A testemunha sem inoculação com o patógeno ou com os agentes de biocontrole apresentou a massa seca similar aos tratamentos com *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03, sem a inoculação do patógeno (Tabela 5). Os valores de massa seca das plantas de pimentão do tratamento testemunha inoculada com *P. aphanidermatum* foram inferiores aos demais tratamentos, não diferindo estatisticamente dos tratamentos que receberam os agentes de biocontrole e a inoculação com o patógeno (Tabela 5). A relação entre a massa do sistema aéreo e do sistema radicular seco foi significativamente maior nos tratamentos inoculados com o patógeno em comparação com os tratamentos não inoculados (Tabela 5).

Experimento III. Efeito da aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação com *Pythium aphanidermatum* sobre a podridão radicular e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico

A aplicação dos agentes de controle biológico na solução nutritiva de cultivo de pimentão não diminuiu a severidade da podridão de raiz nas plantas de pimentão a 27°C ±1 °C (Figura 8). *P. aphanidermatum* foi recuperado em 100% das raízes dos tratamentos em que foi inoculado, não ocorrendo a sua recuperação nos tratamentos em que o patógeno

não foi inoculado (dados não mostrados). Nos tratamentos testemunha, *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03, sem a inoculação do patógeno, não foram verificados sintomas de podridão de raízes (Figura 8). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as áreas abaixo da curva de progresso da doença, pelo teste F (Tabela 6).

O crescimento foliar das plantas do tratamento testemunha sem a inoculação do patógeno e dos agentes de biocontrole foi inferior ao crescimento das plantas tratadas com *B. subtilis* sem a inoculação do patógeno, sendo esse superior aos demais tratamentos (Figura 9). O tratamento com *P. chlororaphis* 63-28 sem a inoculação do patógeno teve resultado similar ao tratamento testemunha sem inoculação (Figura 9). Nos tratamentos com a inoculação do patógeno, a adição dos agentes de biocontrole teve efeito positivo, aumentando a área, apesar dessa diferença não ser estatisticamente diferente (Tabela 6). A inoculação de *P. aphanidermatum* diminuiu a área abaixo da curva de crescimento foliar das plantas (Tabela 6).

A taxa de crescimento foliar da testemunha sem a inoculação do patógeno e a introdução dos agentes de biocontrole foi inferior a taxa de crescimento foliar das plantas tratadas com *B. subtilis* GB03 sem a inoculação do patógeno, que obteve a maior taxa de crescimento foliar (Figura 10). A aplicação de *P. chlororaphis* na solução nutritiva das plantas não inoculadas com o patógeno não diferiu da testemunha sem inoculação quanto à taxa de crescimento foliar (Figura 10). Em plantas inoculadas com o patógeno a introdução na solução nutritiva dos agentes de biocontrole promoveu a taxa de crescimento foliar das plantas, sendo que as inoculadas com o patógeno sem a adição dos agentes de biocontrole apresentaram a menor taxa de crescimento foliar (Figura 10). Efeito positivo na área abaixo da taxa de crescimento foliar foi verificado com a adição de *B. subtilis* GB03, apesar de não diferir estatisticamente da testemunha sem inoculação e do tratamento com a adição de *P. chlororaphis* 63-28 (Tabela 6). A inoculação de *P. aphanidermatum* diminuiu a área da taxa de crescimento foliar, não diferindo estatisticamente do tratamento com a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28. Apesar de não diferir estatisticamente dos tratamentos onde as plantas foram inoculadas com o patógeno, a área abaixo da taxa de crescimento foliar das plantas teve um efeito positivo com a adição de *B. subtilis* GB03 (Tabela 6).

O conteúdo de clorofila foliar foi o mesmo para os tratamentos testemunha, *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 sem a inoculação do patógeno (Tabela 7). Por outro lado, *P. chlororaphis* em plantas inoculadas com o patógeno aumentou o teor de clorofila foliar, não diferindo do tratamento com *B. subtilis* GB03 com a inoculação do patógeno. O tratamento testemunha inoculada apresentou o menor conteúdo de clorofila foliar (Tabela 7).

A altura das plantas foi semelhante para os tratamentos testemunha, *B. subtilis* GB03 e *P. chlororaphis* 63-28 sem a inoculação com o patógeno (Tabela 7). Comportamento similar foi verificado nas plantas inoculadas com o patógeno, que não diferiram entre si estatisticamente, com relação à altura média (Tabela 7). Os dados de massa fresca de frutos imaturos não diferiram pelo teste F (Tabela 7).

As massas fresca e seca das plantas de pimentão do tratamento testemunha, com e sem a adição dos microrganismos, apresentaram o mesmo comportamento, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 8). Em plantas inoculadas com o patógeno e tratadas com *P. chlororaphis* ou *B. subtilis* GB03 os valores médios de massa fresca e seca foram similares e não apresentaram diferenças (Tabela 8). Os tratamentos em que o patógeno foi inoculado apresentaram os maiores valores de relação entre a massa da parte aérea pela massa do sistema radicular, em comparação aos tratamentos não inoculados com o patógeno (Tabela 8).

Experimento IV. Efeito da aplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 sete dias antes e no dia da inoculação com *Pythium aphanidermatum*, e da aplicação de *Bacillus subtilis* GB03 sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação do patógeno sobre a podridão radicular e o desenvolvimento vegetal de pimentão hidropônico

A aplicação de *B. subtilis* GB03 propiciou menor tendência de desenvolvimento da podridão radicular por um período de até 14 dias após a inoculação das plantas com o patógeno, após esse período, o desenvolvimento da doença foi superior aos das plantas inoculadas com o patógeno, sem a adição dos agentes de biocontrole (Figura 11). A incidência do patógeno foi de 100% em todos os tratamentos em que esse foi inoculado (dados não mostrados). Não foram observados sintomas de podridão de raiz nos

tratamentos em que o patógeno não foi inoculado (Figura 11). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as áreas abaixo da curva de progresso da doença dos tratamentos das plantas inoculadas com o patógeno (Tabela 9).

O crescimento foliar das plantas do tratamento *P. chlororaphis* sem a inoculação do patógeno apresentou maior tendência de crescimento a partir do quinto dia após a inoculação das plantas. No entanto, sua área abaixo da curva de crescimento foliar não diferiu da área do tratamento testemunha sem inoculação (Figura 12 e Tabela 9). Não foi verificado efeito positivo da adição de *B. subtilis* GB03 sobre o crescimento foliar das plantas sem a inoculação ou inoculadas com o patógeno (Figura 12). Plantas inoculadas com o patógeno, sem a aplicação de *P. chlororaphis* e *B. subtilis*, apresentaram o menor crescimento foliar a partir do quinto dia após a inoculação das plantas (Figura 12 e Tabela 9). No mesmo período, foi verificado efeito positivo da aplicação de *P. chlororaphis* nas plantas inoculadas com o patógeno (Figura 12 e Tabela 9).

Maior tendência foi observada para a taxa de crescimento foliar do tratamento *P. chlororaphis* sem a inoculação do patógeno (Figura 13). No entanto, essa diferença não foi expressa nas áreas abaixo da curva da taxa de crescimento foliar (Tabela 9). A inoculação das plantas com o patógeno causou diminuição da taxa de crescimento foliar (Figura 13 e Tabela 9). A aplicação de *P. chlororaphis* promoveu a taxa de crescimento foliar das plantas inoculadas com o patógeno, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa com relação às áreas abaixo da taxa de crescimento foliar (Figura 13 e Tabela 9).

Em plantas dos tratamentos testemunha sem inoculação, *P. chlororaphis* e *B. subtilis* sem a inoculação com *P. aphanidermatum*, o conteúdo médio de clorofila foliar foi semelhante (Tabela 10). A inoculação das plantas de pimentão com *P. aphanidermatum* diminuiu o conteúdo de clorofila foliar nas plantas. A aplicação dos agentes de biocontrole não promoveu o conteúdo de clorofila foliar nas plantas, não diferindo estatisticamente das plantas inoculadas com o patógeno, sem a aplicação dos agentes de biocontrole (Tabela 10). Plantas dos tratamentos testemunha, *B. subtilis* e *P. chlororaphis* sem a inoculação com o patógeno apresentaram a mesma altura média (Tabela 10). A inoculação das plantas com *P. aphanidermatum* diminuiu a altura das plantas, sendo que não foram encontradas

diferenças entre os tratamentos inoculados com o patógeno com a adição dos isolados bacterianos (Tabela 10). A massa dos frutos de pimentão imaturos não foi significativa pelo teste F (Tabela 10).

As plantas do tratamento testemunha sem a inoculação do patógeno apresentaram valores semelhantes quanto à massa do sistema radicular das que foram infestadas com o *P. chlororaphis* ou *B. subtilis*, sem a inoculação com *P. aphanidermatum* (Tabela 11). Em plantas inoculadas com o patógeno os valores de massa do sistema radicular foram inferiores quando comparados com as plantas não inoculadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos inoculados com o patógeno e tratados ou não com as bactérias (Tabela 11). A massa fresca total das plantas apresentou o mesmo comportamento da massa fresca do sistema aéreo ou radicular, onde somente foram encontradas diferenças entre os tratamentos inoculados ou não com o patógeno, independentemente da presença dos agentes de biocontrole (Tabela 11). A massa seca total das plantas não diferiu estatisticamente pelo teste F (Tabela 11). A relação entre a massa do sistema aéreo e a massa do sistema radicular foi maior nos tratamentos inoculados com o patógeno, em relação aos tratamentos que não foram inoculados (Tabela 11). A massa do sistema aéreo das plantas não diferiu estatisticamente pelo teste F (Tabela 11).

Discussão

A inoculação das plantas de pimentão com *P. aphanidermatum* promoveu o desenvolvimento da podridão radicular (Figuras 1, 4, 8 e 11) e reduziu o crescimento foliar (Figuras 2, 3, 5, 6, 9, 20, 12 e 13), a produção (Figura 7), a massa, a altura das plantas e o conteúdo de clorofila foliar (Tabelas 4, 5, 7, 8, 10 e 11). Resultados similares de reduções na massa fresca e na área foliar foram verificados após a inoculação de raízes de pimentão hidropônico com *P. aphanidermatum* por Johnstone et al. (2005), Khan et al. (2003) e Owen-Going (2002). Entretanto, os autores não verificaram diminuição no conteúdo de clorofila foliar nas plantas inoculadas com o patógeno. A incidência do patógeno nas raízes das plantas inoculadas foi de 100%, o mesmo foi verificado por Johnstone et al. (2005) na incidência de *P. aphanidermatum* nas raízes das plantas de pimentão (95-100%).

A diminuição do crescimento foliar das plantas inoculadas com *P. aphanidermatum* pode ocorrer devido à limitação do suprimento de água para a expansão foliar; inibição química originária da zona radicular e maior transporte de nutrientes essenciais e fotoassimilados para a zona radicular, causando a diminuição do transporte para o sistema aéreo, resultando no detrimento do fornecimento de compostos necessários para o desenvolvimento de folhas jovens. Por sua vez, a diminuição da área foliar causa a diminuição da fotossíntese e do crescimento em plantas (Johnstone et al. 2005). O patógeno infecta as raízes e anteriormente a exibição de sintomas de podridão ocorre mudança no padrão de distribuição de fotoassimilados, sendo requerida maior quantidade desses pelas raízes doentes. Com o desenvolvimento da doença ocorre o detrimento do fornecimento de fotoassimilados para as folhas jovens, com subdesenvolvimento das mesmas. O subdesenvolvimento foliar causa a diminuição da fotossíntese na planta, ocorrendo a diminuição do desenvolvimento da massa vegetal, e consequentemente da produção. Com o prolongamento do requerimento de fotoassimilados pelas raízes e o subdesenvolvimento vegetal a planta pode entrar em colapso devido à produção insuficiente de fotoassimilados para o crescimento e a produção de compostos para protegê-las do estresse hídrico e da produção de toxinas e/ou fitohormônios originários das raízes doentes, ocorrendo a murcha e subsequente morte das plantas (Johnstone et al. 2005).

O cultivo do pimentão em câmaras de crescimento com as temperaturas de $24-27 \pm 1^\circ\text{C}$ nos experimentos II, III e IV propiciou rápido desenvolvimento da podridão radicular nas plantas inoculadas com o patógeno (Figuras 4, 8 e 11), independente da introdução na solução nutritiva dos agentes de biocontrole ou não quando comparado com as plantas cultivadas a $21-24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 1). Elevadas temperaturas são extremamente importantes para aumentar a severidade da podridão radicular por predispor as plantas à doença e aumentar a velocidade do ciclo do patógeno (Bates e Stanghellini, 1984; Gold e Stanghellini, 1985; Owen-Going et al. 2003; Sutton et al. 2006).

As maiores tendências de supressão da podridão de raiz por *P. chlororaphis* 63-28 foi verificada no experimento I onde as temperaturas foram de $21-24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 1) e no experimento IV onde as temperaturas foram de $24-27 \pm 1^\circ\text{C}$ e a inoculação das raízes das plantas foi realizada em 30% do volume radicular (Figura 11). A aplicação de *B. subtilis*

GB03 na solução nutritiva teve os melhores efeitos na redução da doença nos experimentos II (Figura 4) e IV (Figura 11). No experimento IV tendência de supressão da doença por *B. subtilis* foi limitada até os 14 dias após a inoculação das plantas, indicando a necessidade de reaplicação do bioproduto. O fabricante do bioproduto Companion[®] recomenda a sua aplicação em intervalos de 5-7 dias em cultivos hidropônicos comerciais (Growth Products, 2009). O desenvolvimento moderado da doença, encontrado nos experimentos I e IV, pode ter sido a causa da melhor resposta dos tratamentos com os agentes de biocontrole. Nos experimentos realizados, o patógeno sempre foi re-isolado das raízes do experimento anterior para a utilização nos experimentos subsequentes. Esse re-isolamento pode ter causado o aumento da virulência de *P. aphanidermatum*, resultando na falta de controle da doença pelos agentes de biocontrole no experimento III.

A adição de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 na solução nutritiva antes da inoculação do patógeno em diferentes períodos teve efeito positivo no crescimento foliar de pimentão hidropônico (Figuras 5, 6, 9, 10, 12 e 13). Os mecanismos de ação dos agentes de biocontrole envolvidos no maior crescimento foliar podem ter sido a produção de hormônios promotores de crescimento (EPA, 2009), a indução de resistência (Zheng et al. 2000), a competição com o patógeno pelas zonas de colonização radicular (Zheng et al. 2000) e a produção de compostos tóxicos ao patógeno, como a fenazina produzida por *P. chlororaphis* 63-28 e a iturina produzida por *B. subtilis* GB03 (EPA, 2009). A introdução na solução nutritiva de *P. chlororaphis* 63-28 em plantas não inoculadas com o patógeno também teve efeito positivo no crescimento foliar (Figuras 2, 5, 6, 12 e 13) e no aumento na produção de frutos (Figura 7). O melhor efeito no crescimento de pimentão foi observado quando *B. subtilis* GB03 foi aplicado três vezes na solução nutritiva em plantas não inoculadas com o patógeno (Figuras 9 e 10). No entanto, quando *P. chlororaphis* 63-28 foi aplicada três vezes na solução nutritiva não foi verificado efeito positivo no crescimento foliar (Figuras 9 e 10), indicando que houve “overdose” da população bacteriana na zona radicular. A produção de hormônios de crescimento pelos microrganismos nas raízes das plantas pode ter sido a causa direta da promoção de crescimento e do aumento na produção. Isolados de *P. chlororaphis* são eficientes agentes de controle biológico da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e de promoção de crescimento e de produção em

plantas cultivadas em hidroponia (Zheng et al. 2000; Khan et al. 2003; Chatterton et al. 2004).

O controle da podridão radicular causada por *Pythium* spp. em hidroponia é difícil devido à suscetibilidade das plantas cultivadas e ao ambiente ser conducente ao desenvolvimento de epidemias da doença. Em hidroponia, as raízes, os exsudados radiculares e a circulação da solução nutritiva proporcionam um ambiente favorável ao crescimento, reprodução e dispersão de zoósporos e fragmentos de hifas do patógeno (Owen-Going et al., 2003; Sutton et al. 2006). A aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 na solução nutritiva promoveu o desenvolvimento vegetal, expresso pelo crescimento foliar, de plantas inoculadas ou não com *P. aphanidermatum* e diminuiu a severidade da podridão de raiz quando aplicados na concentração correta em plantas que foram inoculadas com uma elevada população de zoósporos do patógeno. Conclui-se que, a utilização dos agentes de biocontrole *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 tem potencial para suprimir os danos causados pela podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* em pimentão hidropônico. No entanto, experimentos em cultivos comerciais devem ser realizados para a eliminação de erros inerentes de testes em pequena escala, como a utilização de elevada concentração de zoósporos para a inoculação das plantas, quando comparados com os níveis encontrados em sistemas hidropônicos comerciais.

Referências

Bates, M.L.; Stanghellini, M.E. 1984. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum*. *Plant Dis.* 68 :989-991.

Bochow, H. 1992. Phytosanitary effects of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. *Inter. Symp. Over Fytofarmacien-Fytiatrie.* 57 : 387-393.

Corrêa, E. B.; Bettioli, W.; Morandi, M. 2005. Controle Biológico da podridão de raízes induzida por *Pythium aphanidermatum* em plantas de alface em sistema hidropônico com *Clonostachys rosea*. *Fitopatol. Brasil.* 30: 91.

EPA - United States Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/product_lists/new_ai_2007.htm, acesso em 22 de março de 2009.

Chatterton, S.; Sutton, J. C. e Boland, G.J. 2004. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. *Biol Control.* 30: 360-373.

Gagné, S.; Dehbi, L.; Le Quéré, D.; Cayer, F.; Morin, J-L.; Lemay, R.; Fournier, N. 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat based growing media. *Soil Biol. Bioch.* 25 : 269-272.

Gold, S. E.; Stanghellini, M. E. 1985. Effects of temperature on *Pythium* root rot of Spinach grown under hydroponic conditions. *Phytopathology.* 75:333-337.

Growth Products. Disponível em: <http://www.growthproducts.com/pages/horticulture.asp?tables=featured&product=10>, acesso em 25 de março de 2009. **NEW BIOPRODUCTS** - http://newbioproducts.net/index_files/Page797.htm, acesso em 02 de abril de 2009.

Huang, R.; Jarvis, W.R. 2002. Greenhouse crop losses: Disease. In: *Encyclopedia of Pest Management.* D. Pimental, ed. Marcel Dekker, New York, p. 348-352.

- Johnstone, M.; Chatterton, S.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B.** 2005. Net carbon gain growth of bell peppers, *Capsicum annuum* 'Cubico', following root infection by *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*. 95 : 354-361.
- Khan, A.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B.** 2003. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocont. Scien. Technol.** volume p.1-16.
- Liu, W.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B.; Kloepper, J.W.; Reddy, M.S.** 2007. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. *Phytoparasitica* 35: 159-178.
- Liu, W.; Sutton, J.C.** Effectiveness of microbial agents to protect *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. *B&C Tests*, v. 18, p.1-2, 2003. Disponível em: <www.apsnet.org/online/BCtests/reports/2003/V023.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2007.
- Mccullagh, M.; Utkehede, R.; Menzies, J.G.; Punja, Z.K.; Paulitz, T.C.** 1996. Evaluation of growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *Eur. J. Plant Pathol.* 102 :747-755.
- Nemec, S.; Datnoff, L.E.; Strandberg, J.** 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protec.* 15:735-742.
- Oliveira, J.M.F.De; Luz, F.J.** Orientação para cultivo do pimentão em Roraima. Boa Vista: Embrapa. Roraima, 1998. 24 p.
- Owen-Going, T.N.; Sutton, J.C; Grodzinski.** 2003. Relationship of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Can. J. Plant Pathol.* 25 : 155-167.
- Paulitz, T.C.; Zhou, T., Rankin, L.** 1992. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. *Biol. Control* 2: 226-237.
- Paulitz, T.C.; Bélanger, R.R.** 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Rev. of Phytopathol.* 39 : 103-133, 2001.
- Pernezny, K.; Roberts, P.D.; Murphy, J.F.; Goldberg, N.P.** 2003. Compendium of pepper diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul.

Postma, J.; Willemsen-De Klein, M.E.I.M.; Van Elsas, J.D. 2000. Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. *Phytopathology* 90: 125-133.

Rankin, R.; Paulitz, T.C. 1994. Evaluation of rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. *Plant Dis.* 78 :447-451.

Shaner, G.; Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67 :1051-1056.

Stanghellini, M.E.; Kronland, W.C. 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets of *Pythium dissotocum*. *Plant Dis.* 70 : 1053-1056.

Sutton, J.C.; Sopher, C.R.; Owen-Going, T.N.; Liu, W.; Grodzinski, B.; Hall, J.C.; Benchimol, R.L. 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa. Phytopathol.* 32 : 307-321.

Utkhede, R.S.; Lévesque, C.A.; Dinh, D. 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Can. J. of Plant Pathol.* 22: 138-144.

Zheng, J.; Sutton, J.C.; Yu, Hi. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. *Can. J. Plant Pathol.* 22 :368-379.

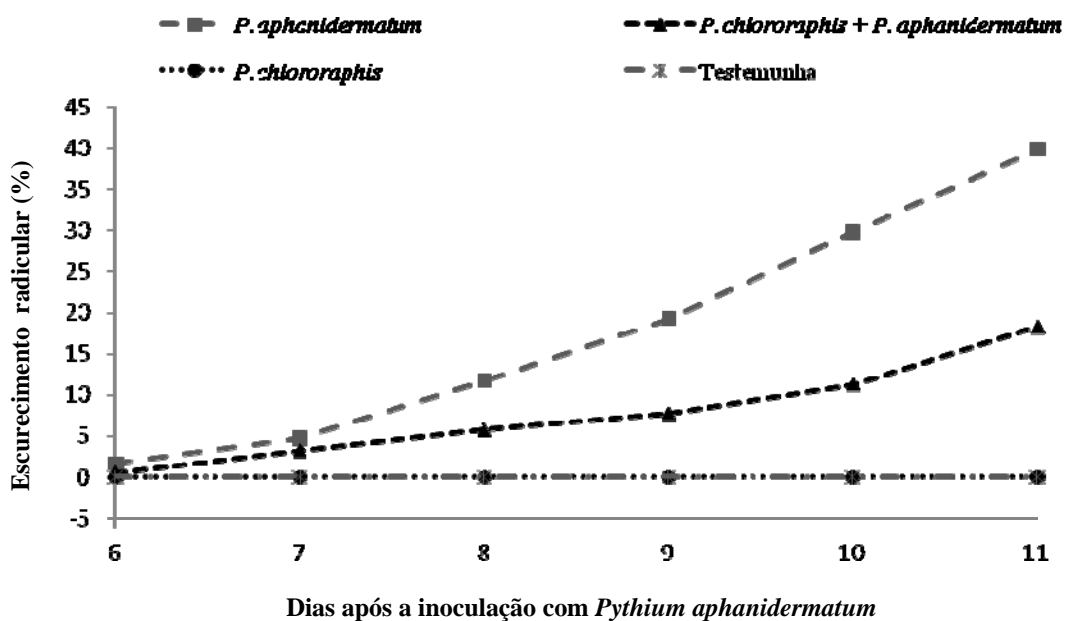


Figura 1. Progresso da podridão radicular após a introdução da solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, sete dias antes à inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

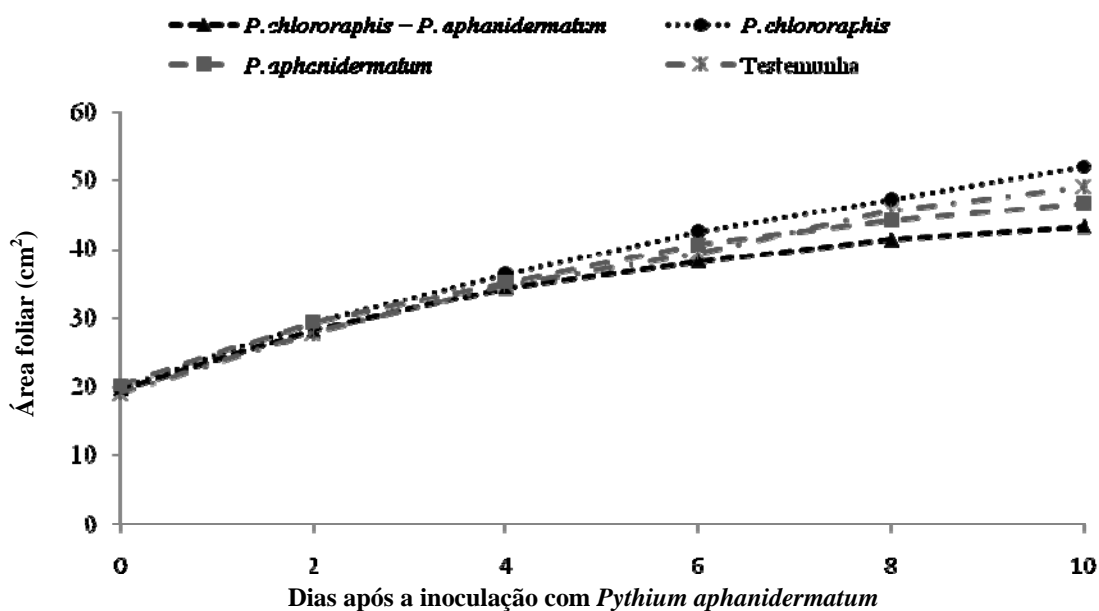


Figura 2. Crescimento foliar de uma folha jovem de plantas de pimentão hidropônico após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, sete dias antes da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

Tabela 1. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, aos sete dias antes à inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a área abaixo da curva de crescimento foliar (AACCF).

Tratamento	AACPD	AACCF
Testemunha	-	363,57
<i>P. aphanidermatum</i>	87,20 *	365,91
<i>P. chlororaphis</i>	-	382,64
<i>P. aphanidermatum</i> + <i>P. chlororaphis</i>	37,43	347,70

* Dados não significativos pelo teste F.

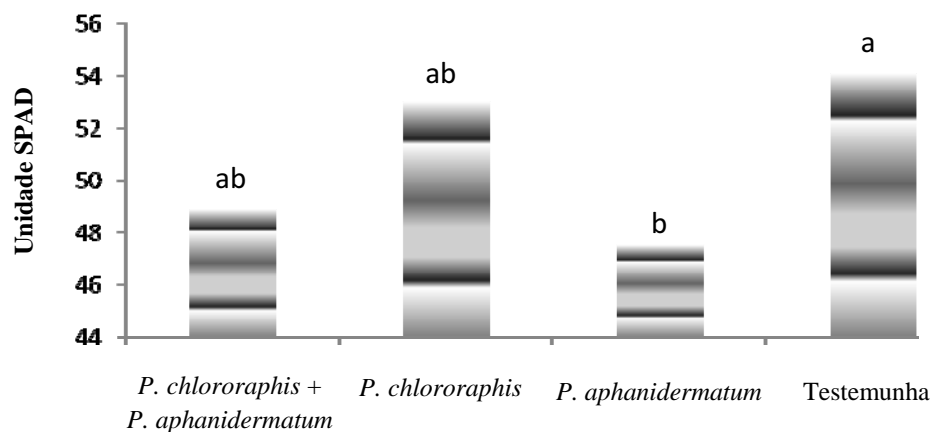


Figura 3. Valores médios do teor de clorofila em folhas de pimentão hidropônico após introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, sete dias antes à inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, aos 11 dias após inoculação das plantas com o patógeno. Dados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

Tabela 2. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, aos sete dias antes da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa seca das plantas, aos 11 dias após a inoculação das plantas com o patógeno

Tratamento	Massa seca do sistema aéreo (g)	Massa seca do sistema radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha	7,82 *	0,59	8,41
<i>P. aphanidermatum</i>	7,43	0,44	7,86
<i>P. chlororaphis</i>	7,59	0,55	8,14
<i>P. aphanidermatum</i> + <i>P. chlororaphis</i>	7,11	0,41	7,52

* Dados não significativos pelo teste F.

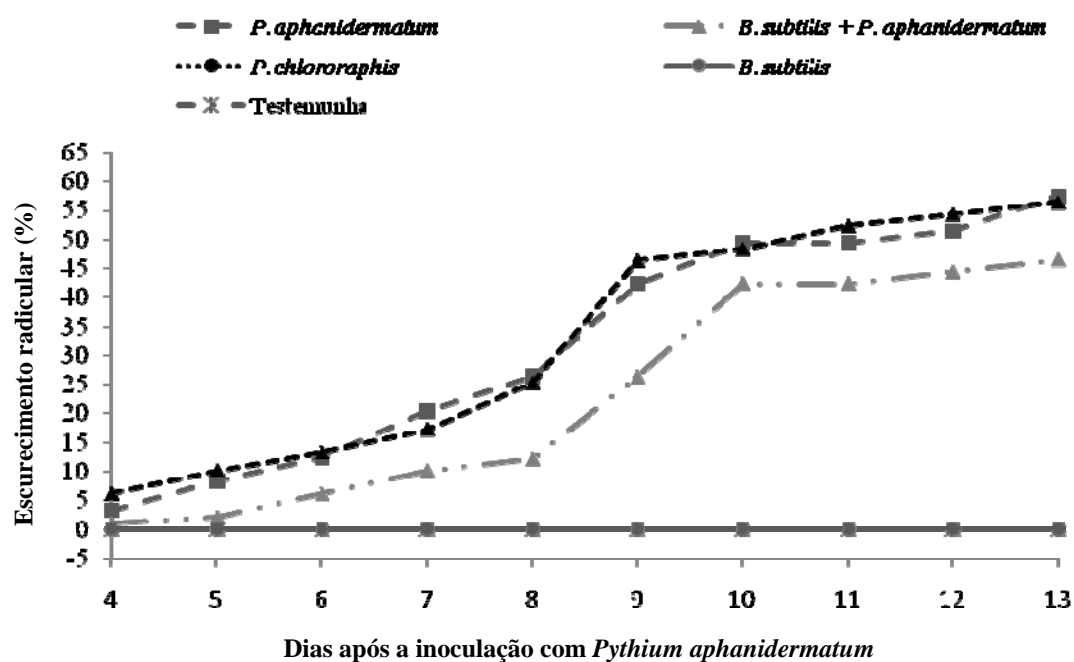


Figura 4. Progresso da podridão radicular após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

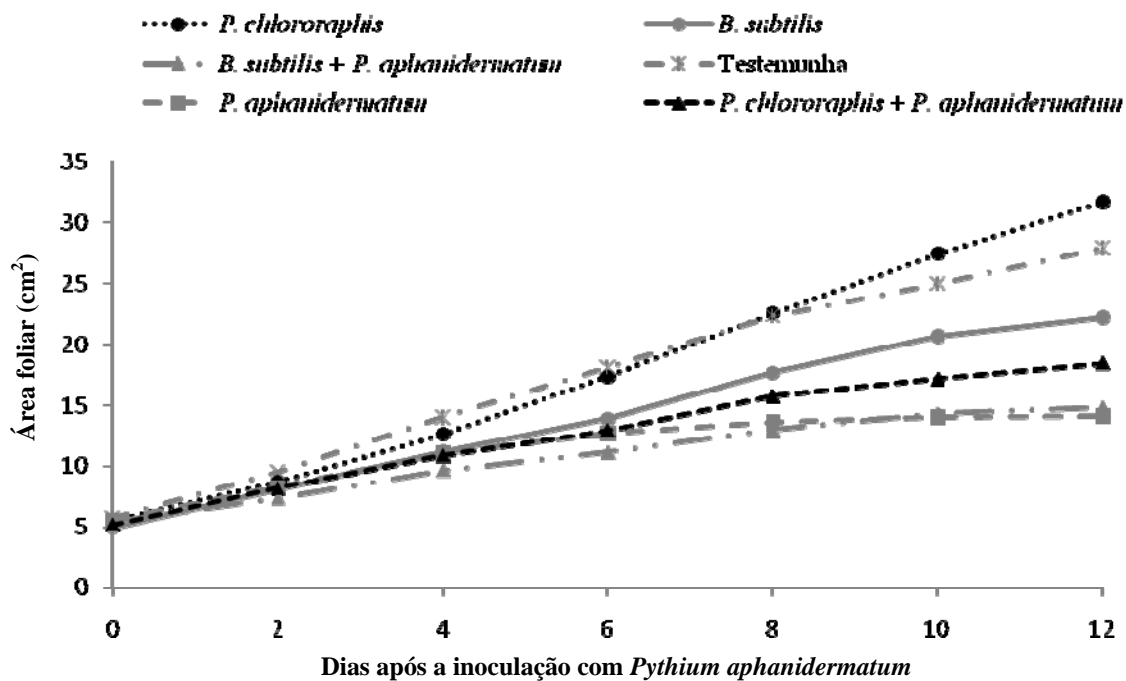


Figura 5. Crescimento foliar de pimentão hidropônico após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

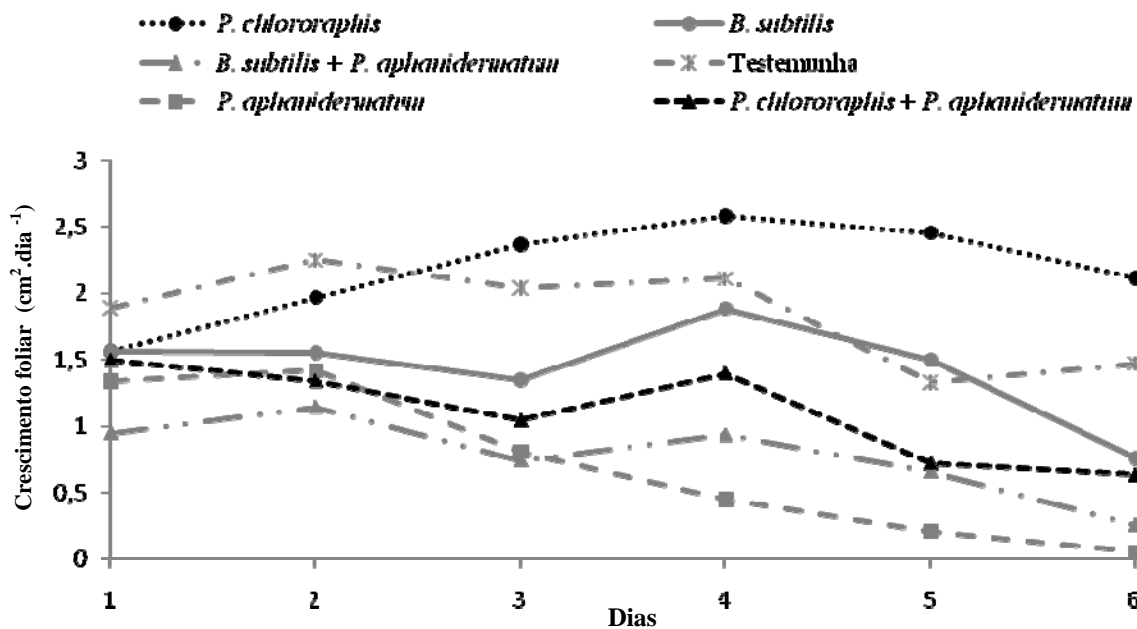


Figura 6. Taxa de crescimento de folhas de pimentão hidropônico após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

Tabela 3. Efeito da introdução ou não na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), a área abaixo da curva de crescimento foliar (AACCF) e da área abaixo da taxa de crescimento foliar (AATC).

Tratamento	AACPD	AACCF	AATC
Testemunha	-	211,5 ab**	9,42 ab
<i>P. aphanidermatum</i>	290,9*	139,1 c	3,66 c
<i>B. subtilis</i>	-	170,1 abc	7,46 abc
<i>P. chlororaphis</i>	-	214,5 a	11,22 a
<i>B. subtilis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	210,2	131,2 c	4,09 c
<i>P. chlororaphis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	299	153,2 bc	5,58 bc

* Dados não significativos pelo teste F.** Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

Tabela 4. Efeito da introdução ou não na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes, e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, aos 14 dias após a inoculação das plantas com o patógeno sobre o valor médio de clorofila foliar e a altura das plantas.

Tratamento	Clorofila foliar (unidade SPAD)	Altura (cm)
Testemunha	60,02 a	25,00 a
<i>P. aphanidermatum</i>	48,43 b	19,66 b
<i>B. subtilis</i>	61,43 a	26,60 a
<i>P. chlororaphis</i>	61,90 a	26,10 a
<i>B. subtilis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	51,22 b	20,20 b
<i>P. chlororaphis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	51,25 b	20,60 b

* Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

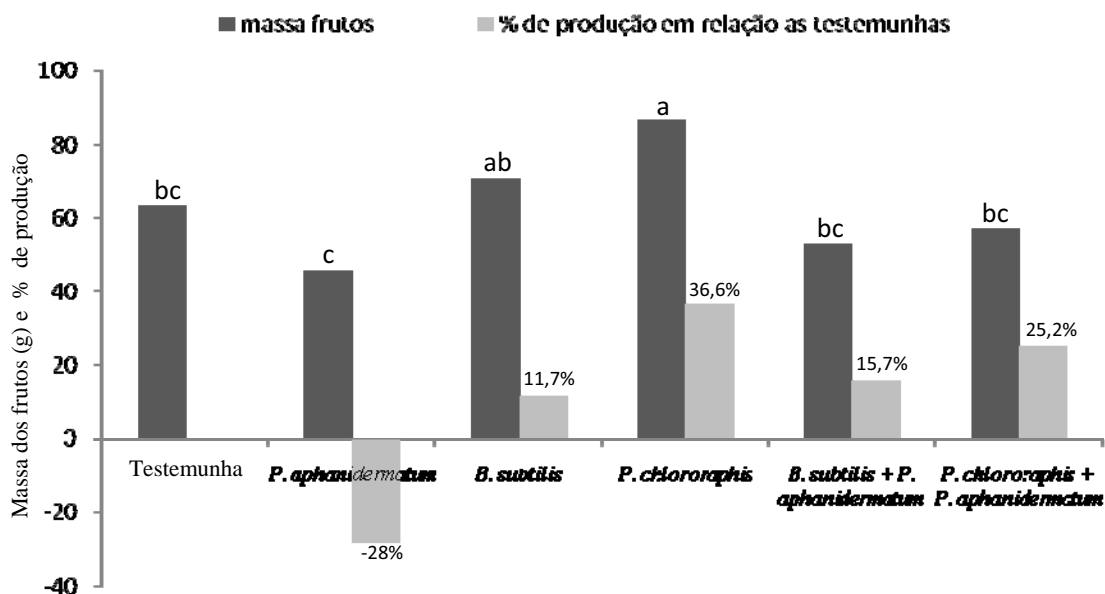


Figura 7. Massa dos frutos de pimentão hidropônico, após introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, e porcentagem de produção em comparação com as testemunhas (*P. aphanidermatum*, *B. subtilis* e *P. chlororaphis* comparados com o tratamento testemunha sem inoculação; *B. subtilis* + *P. aphanidermatum* e *P. chlororaphis* + *P. aphanidermatum*, comparados com o tratamento *P. aphanidermatum*; e tratamento *P. aphanidermatum* comparado com a testemunha sem a inoculação com o patógeno), após 14 dias da inoculação com o patógeno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD.

Tabela 5. Efeito da introdução ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, aos sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa fresca das plantas, aos 14 dias após a inoculação das plantas com o patógeno

Tratamento	Massa fresca sistema aéreo (g)	Massa fresca sistema radicular (g)	Massa fresca total (g)	Massa aérea/massa radicular
Testemunha	114,30 a *	44,32 a	158,61 a	2,64 **
<i>P. aphanidermatum</i>	69,30 c	13,22 b	82,52 b	6,95
<i>B. subtilis</i>	115,88 a	46,14 a	162,01 a	2,58
<i>P. chlororaphis</i>	109,66 ab	44,83 a	154,48 a	2,56
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	81,22 c	17,05 b	98,27 b	5,15
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	86,89 bc	21,22 b	108,10 b	5,45
	Massa seca sistema aéreo (g)	Massa seca radicular (g)	Massa fresca total (g)	Massa aérea/massa radicular
Testemunha	15,59 a	3,48 a	19,07 a	4,66 b
<i>P. aphanidermatum</i>	10,05 c	1,06 b	11,10 c	9,96 a
<i>B. subtilis</i>	15,53 a	3,89 a	19,42 a	4,05 b
<i>P. chlororaphis</i>	14,52 ab	3,34 a	17,86 ab	4,45 b
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	11,86 bc	1,36 b	13,22 c	8,94 a
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	11,94 bc	1,57 b	13,51 bc	9,43 a

* Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ** Dados não significativos pelo teste F.

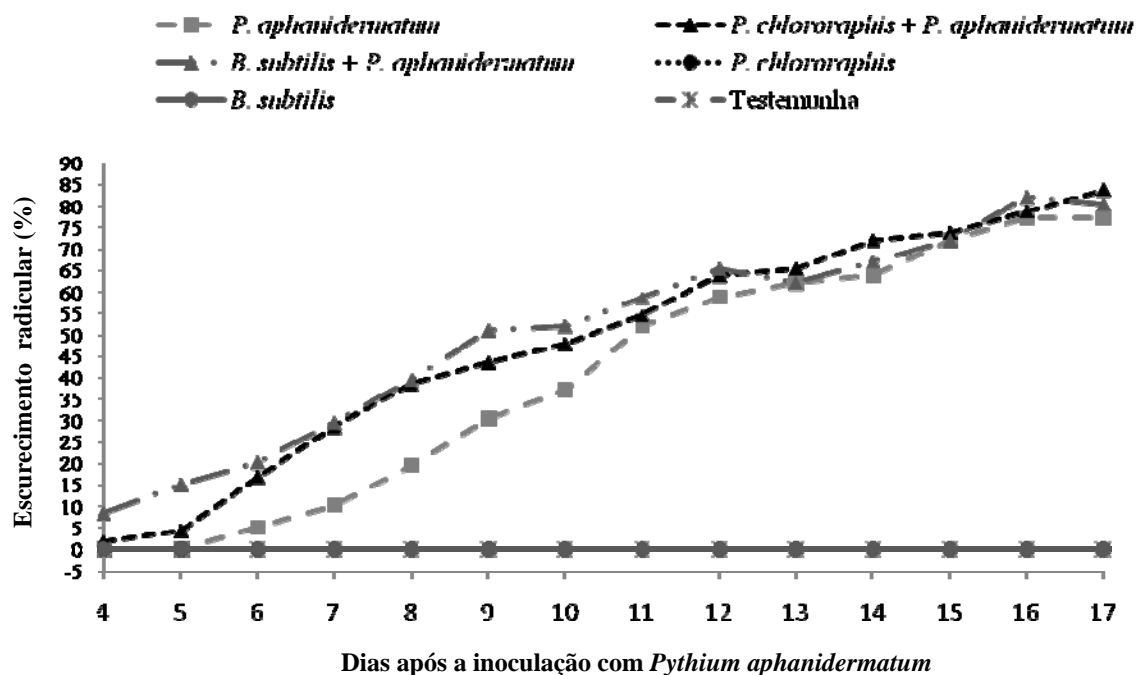


Figura 8. Progresso da podridão radicular após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

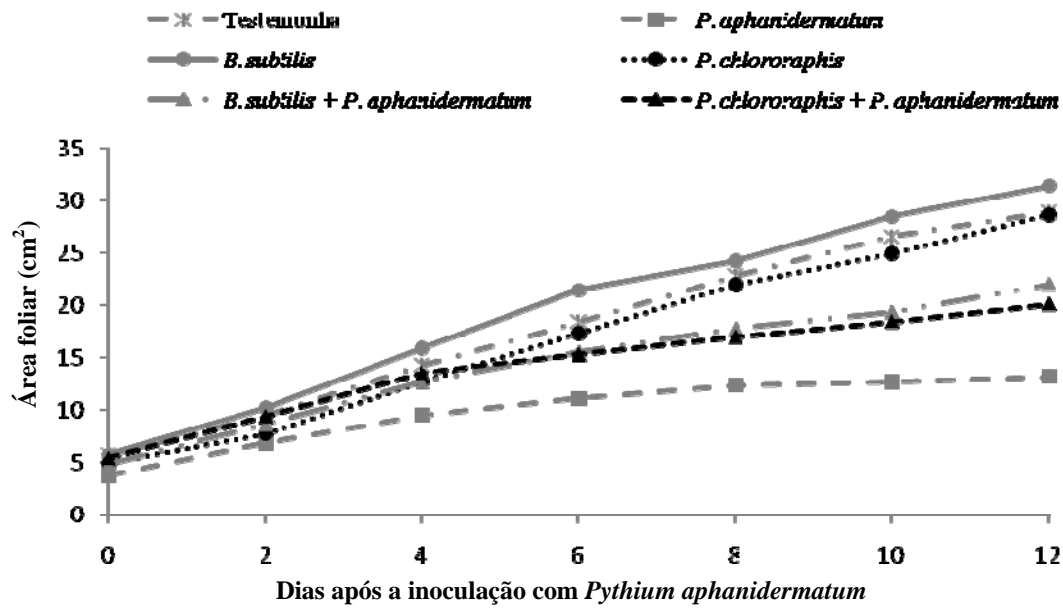


Figura 9. Crescimento foliar de pimentão hidropônico após introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

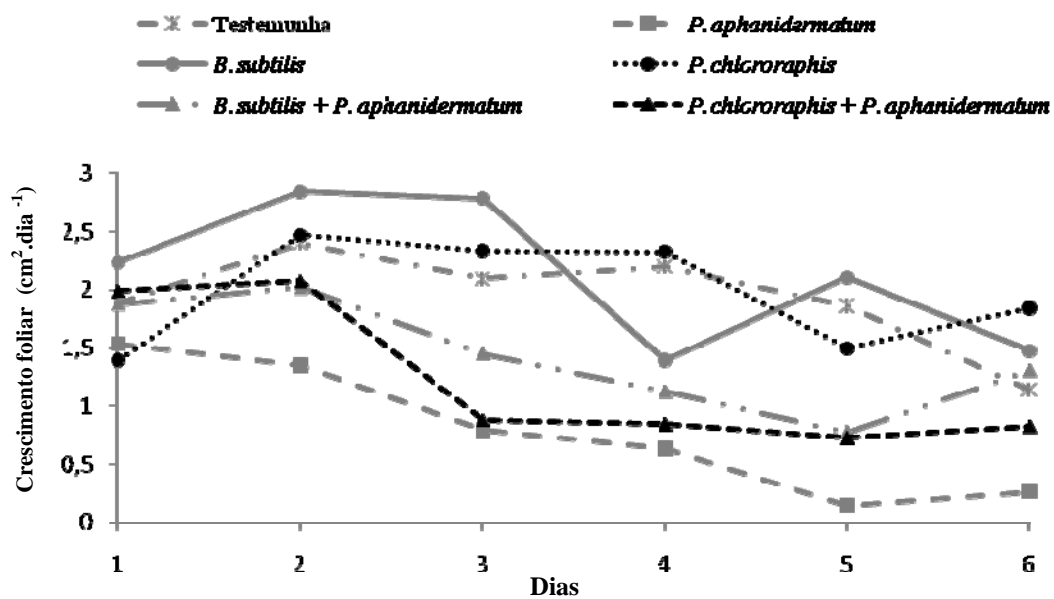


Figura 10. Taxa de crescimento de folhas de pimentão hidropônico, após introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

Tabela 6. Efeito de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 introduzidos ou não na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), a área abaixo da curva de crescimento foliar (AACCF) e da área abaixo da taxa de crescimento foliar (AATC).

Tratamentos	AACPD	AACCF	AATC
Testemunha	-	217,78 a**	10,08 ab
<i>P. aphanidermatum</i>	527,70*	121,88 b	3,87 c
<i>B. subtilis</i>	-	237,71 a	11 a
<i>P. chlororaphis</i>	-	202,70 a	10,26 ab
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	709,6	174,54 ab	7,02 bc
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	636,2	172,34 ab	5,94 c

* Dados não significativos pelo teste F.** Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5-7%.

Tabela 7. Efeito da introdução ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) na solução nutritiva de pimentão hidropônico, aos sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a altura, a massa de frutos imaturos e o valor médio de clorofila foliar das plantas, aos 18 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamentos	Clorofila foliar (unidade SPAD)	Altura (cm)	Massa de frutos imaturos (g)
Testemunha	56,62 a *	25,75 a	26,07 **
<i>P. aphanidermatum</i>	44,85 c	17,16 b	24,70
<i>B. subtilis</i>	57,43 a	26,08 a	25,09
<i>P. chlororaphis</i>	57,55 a	26,58 a	25,36
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	47,87 bc	17,00 b	27,08
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	50,02 b	16,50 b	18,53

* Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ** Dados não significativos pelo teste F.

Tabela 8. Efeito da introdução ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, aos sete dias antes, no dia da inoculação e sete dias após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa das plantas, aos 18 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamento	Massa fresca sistema aéreo (g)	Massa fresca sistema radicular (g)	Massa fresca total (g)	Massa aérea fresca/massa radicular fresca
Testemunha	109,77 a*	44,57 a	154,33 a	2,51 b
<i>P. aphanidermatum</i>	52,13 b	8,62 b	60,75 b	8,25 a
<i>B. subtilis</i>	115,67 a	51,60 a	167,28 a	2,27 b
<i>P. chlororaphis</i>	111,71 a	48,65 a	160,36 a	2,30 b
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	49,78 b	6,33 b	56,12 b	9,50 a
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	53,19 b	6,99 b	60,17 b	8,38 a
	Massa seca sistema aéreo (g)	Massa seca radicular (g)	Massa seca total (g)	Massa aérea seca/massa radicular seca
Testemunha	14,01 a	3,12 a	17,13 a	4,55 b
<i>Pythium aphanidermatum</i>	7,60 b	0,55 b	8,14 b	20,02 a
<i>B. subtilis</i>	14,90 a	3,69 a	18,60 a	4,11 b
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	14,42 a	3,38 a	17,80 a	4,31 b
<i>B. subtilis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	6,89 b	0,48 b	7,38 b	16,86 a
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	7,57 b	0,48 b	8,04 b	17,51 a

* Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

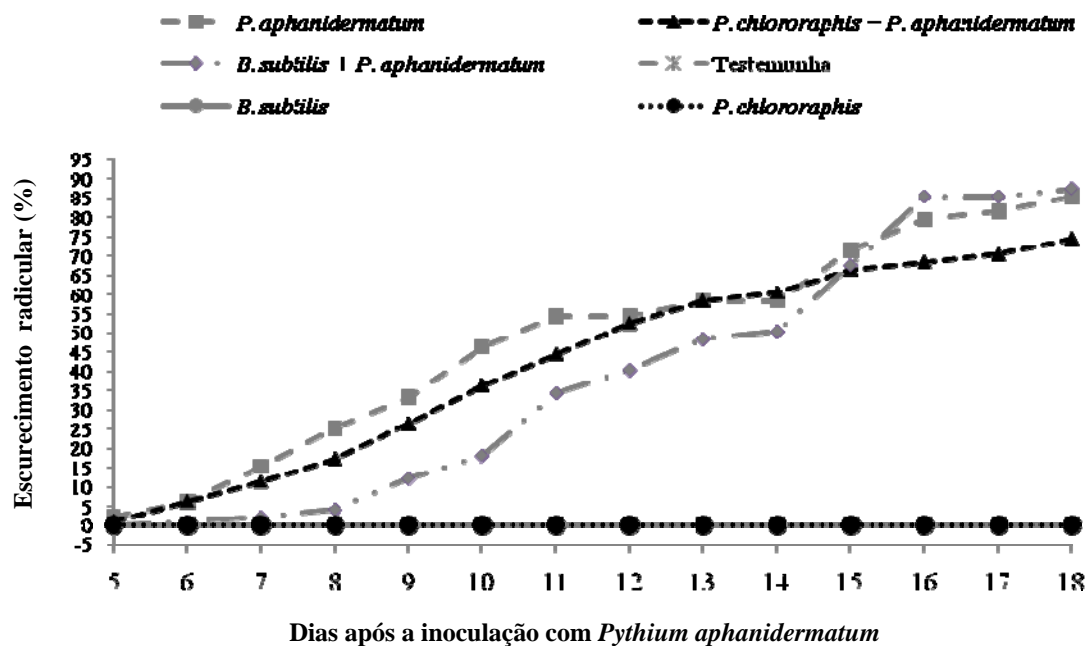


Figura 11. Progresso da podridão radicular após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (sete dias antes e no dia da inoculação) ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®) (sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação) ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

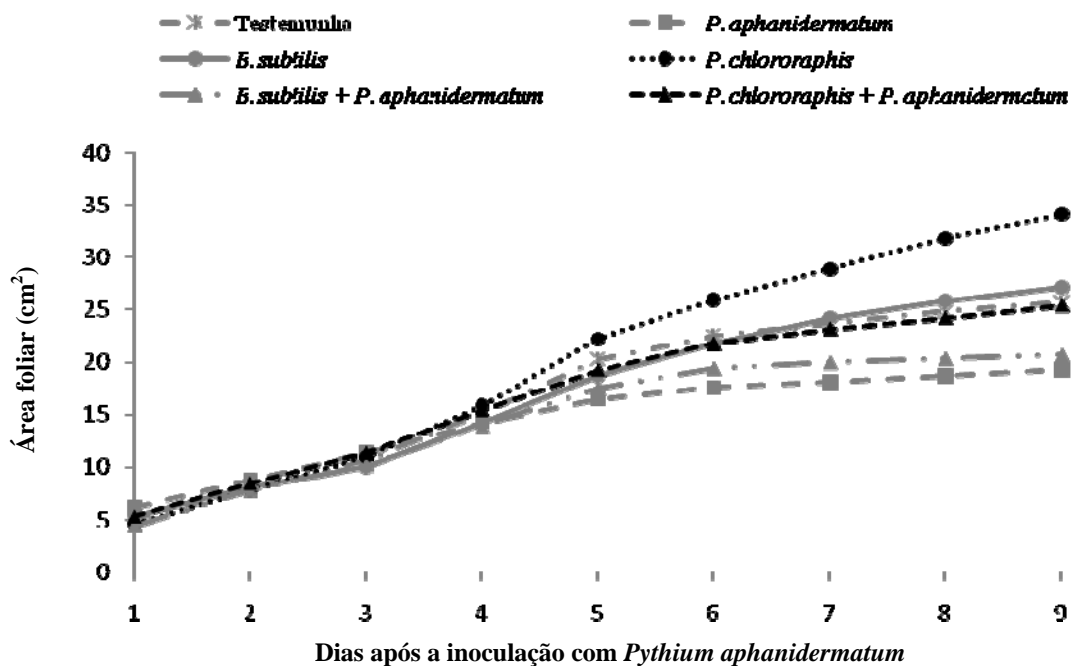


Figura 12. Crescimento foliar de pimentão hidropônico após introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (sete dias antes e no dia da inoculação) ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) (sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação) ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

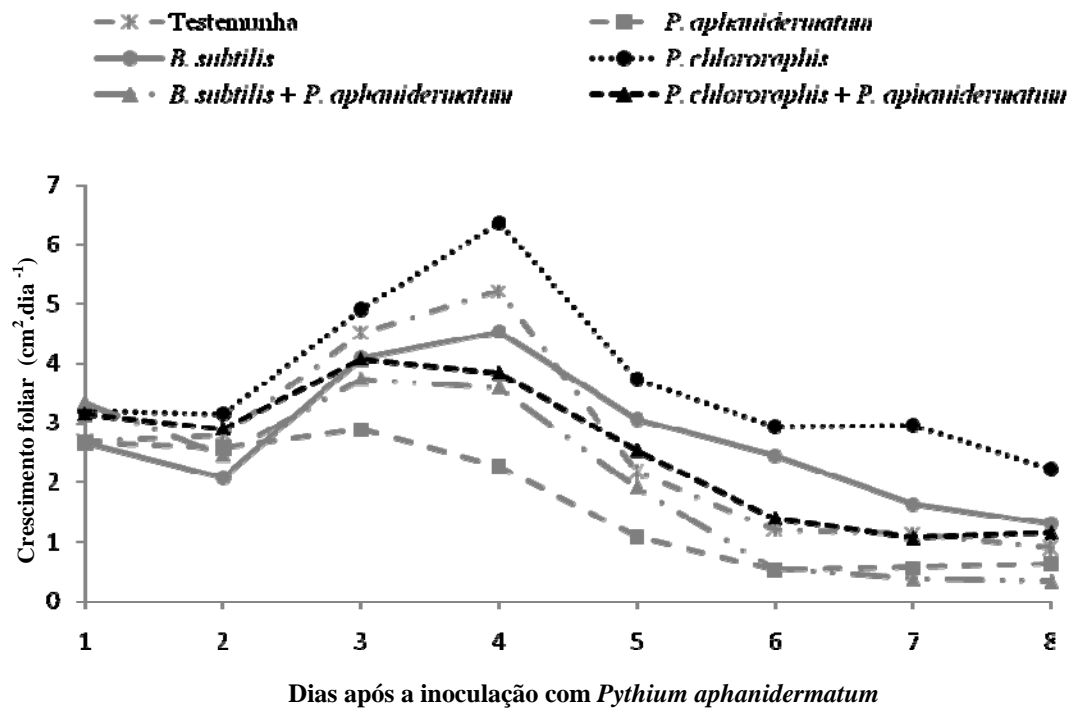


Figura 13. Taxa de crescimento de folhas de pimentão hidropônico após a introdução na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (sete dias antes e no dia da inoculação) ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) (sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação) ou não com *Pythium aphanidermatum*, em plantas de pimentão hidropônico.

Tabela 9. Efeito da introdução ou não na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), a área abaixo da curva de crescimento foliar (AACCF) e da área abaixo da taxa de crescimento foliar (AATC).

Tratamento	AACPD	AACCF	AACCF	AACCF	AATC
		(0 a 4 dias)	(4 a 12 dias)		
Testemunha	-	104,22	216,64 a**	320,86 a	11,21 a
<i>P. aphanidermatum</i>	628,5 *	91,33	144,60 b	235,93 ab	5,95 b
<i>B. subtilis</i>	-	88,38	189,39 ab	277,77 ab	9,95 ab
<i>P. chlororaphis</i>	-	95,87	229,60 a	325,47 a	13,39 a
<i>B. subtilis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	493,8	79,26	141,82 b	221,08 b	6,53 b
<i>P. chlororaphis</i> + <i>Pythium aphanidermatum</i>	556,2	94,56	182,72 ab	277,28 ab	9,05 ab

* Dados não significativos pelo teste F.** Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

Tabela 10. Efeito da introdução ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (sete dias antes e no dia da inoculação) ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) (sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação) na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, após a inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre o valor médio de clorofila foliar, a altura e a massa de frutos imaturos, aos 19 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamentos	Clorofila foliar (unidade SPAD)	Altura (cm)	Massa de frutos imaturos (g)
Testemunha	59,84 a*	25,10 a	19,03 **
<i>P. aphanidermatum</i>	40,14 c	18,20 c	16,29
<i>B. subtilis</i>	53,61 ab	23,90 ab	21,09
<i>P. chlororaphis</i>	56,85 a	25,70 a	13,60
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	47,30 bc	19,90 c	17,74
<i>P.s chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	46,94 bc	20,70 bc	19,63

* Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ** Dados não significativos pelo teste F.

Tabela 11. Efeito da introdução ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (sete dias antes e no dia da inoculação) ou *Bacillus subtilis* GB03 (sete dias antes, no dia e sete dias após a inoculação) na solução nutritiva de plantas de pimentão hidropônico, inoculadas ou não com *Pythium aphanidermatum*, aos 19 dias após a inoculação, sobre a massa fresca das plantas.

Tratamentos	Massa fresca sistema aéreo (g)	Massa fresca sistema radicular (g)	Massa fresca total (g)	Massa aérea/massa radicular
Testemunha	83,08 *	38,93 a **	122,01 a	2,18 b
<i>P. aphanidermatum</i>	47,92	12,31 c	60,23 b	4,00 a
<i>B. subtilis</i>	66,65	28,31 ab	94,96 ab	2,53 b
<i>P. chlororaphis</i>	86,85	39,74 a	126,59 a	2,15 b
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	53,13	15,35 bc	68,47 b	3,65 a
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	60,06	17,33 bc	77,38 b	4,28 a
	Massa seca sistema aéreo (g)	Massa seca radicular (g)	Massa seca total (g)	Massa aérea/massa radicular
Testemunha	11,20	2,51 a	13,72	4,54 b
<i>P. aphanidermatum</i>	6,70	0,75 c	7,44	9,48 a
<i>B. subtilis</i>	8,97	1,90 ab	10,88	5,12 b
<i>P. chlororaphis</i>	11,48	2,61 a	14,10	4,40 b
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	7,48	1,00 bc	8,49	8,52 a
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	8,15	1,19 bc	9,34	8,98 a

* Dados sem letra não foram significativos pelo teste F. ** Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

CAPÍTULO 3

CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO RADICULAR (*Pythium aphanidermatum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO COM *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 E *Bacillus subtilis* GB03 EM ALFACE HIDROPÔNICA

Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica

Élida B. Corrêa⁽¹⁾; John C. Sutton⁽²⁾ e Wagner Bettioli⁽³⁾

⁽¹⁾ Faculdade de Ciências Agrárias, FCA/UNESP, Rod. Alcides Soares Km 3, 18610-307 Botucatu, SP, Brasil, e-mail: elidabcorrea@yahoo.com.br; ⁽²⁾ University of Guelph, Department of Environmental Biology, Guelph, ON N1G 2W1, Canadá; ⁽³⁾ Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 34013820-000, Jaguariúna, SP, Brasil. E-mail: bettioli@cnpma.embrapa.br; ^(1,3) **Bolsistas do CNPq.** ⁽¹⁾ autor para correspondência

Corrêa, E.B.; Sutton, J.C.; Bettioli, W. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica

RESUMO

Podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* são um importante problema em cultivos hidropônicos. Sintomas de subdesenvolvimento são observados nas plantas parasitadas pelo patógeno, sendo muitas vezes não diagnosticados pelo produtor. O objetivo do trabalho foi avaliar o controle biológico da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e a promoção de crescimento com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03, reconhecidos agentes de controle biológico de doenças de plantas. A inoculação das plantas com *P. aphanidermatum* ocasionou o subdesenvolvimento, sendo essa diminuição de 20%. A adição dos agentes de biocontrole na solução nutritiva teve um efeito positivo no desenvolvimento da alface. Entretanto, maiores estudos devem ser realizados para melhorar a capacidade de controle da doença e de promoção de crescimento pelos agentes em alface hidropônica.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, hidroponia, controle biológico.

ABSTRACT

Corrêa, E.B.; Sutton, J.C.; Bettiol, W. Biological control of root rot (*Pythium aphanidermatum*) and growth promotion with *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 in hydroponic lettuce

Root rot caused by *Pythium* species is a major problem in hydroponically-grown crops. Symptoms of canopy stunting are noticed in plants colonized by the pathogen and many times they are not diagnosed by the grower. The aim of this work was to evaluate biological control and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03, known biological control agents of plant diseases. Inoculation of plants with *P. aphanidermatum* decreased lettuce mass by 20%. The introduction of the biocontrol agents to the nutrient solution was beneficial for plant growth. Further studies are needed, however, to improve the effectiveness of disease control and growth promotion by the biological agents in hydroponic lettuce.

Keywords: *Lactuca sativa*, hydroponic, biological control.

INTRODUÇÃO

O cultivo protegido de alface hidropônica é uma atividade que cresce devido à antecipação do ciclo da cultura, a padronização do produto colhido, o maior controle e planejamento da produção e a elevada aceitabilidade do mercado consumidor (4, 5, 24). Apesar das vantagens do cultivo hidropônico, esse ambiente é favorável a ocorrência de podridões radiculares, principalmente as causadas por *Pythium* spp. Fatores como a elevada densidade de plantas, a circulação da solução nutritiva, a adaptação do patógeno às condições aquáticas e a baixa diversidade microbiana são responsáveis pela elevada severidade de podridões radiculares em hidroponia (12, 20, 21, 24).

A ausência de variedades comerciais resistentes às podridões radiculares causadas por *Pythium* spp. e o não registro de fungicidas faz com que produtores utilizem métodos de controle físico, como a desinfestação da solução nutritiva com radiação UV e filtração, para o controle da doença. Entretanto, esses métodos não são efetivos por não afetarem a população do patógeno presente na zona radicular (20). A adição de microrganismos

antagônicos às espécies de *Pythium* em sistemas hidropônicos é uma medida que se mostra eficiente no controle dos danos causados pela doença (1, 2, 7, 14, 16, 21). Além de controlar a doença, microrganismos podem promover o crescimento das plantas aumentando a receita do produtor (2, 14, 21).

Espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* são reconhecidas como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas em cultivos protegidos (13). *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 é um dos melhores isolados bacterianos avaliados para o controle biológico e promoção de crescimento de plantas no Canadá (13). A sua eficiência foi demonstrada no controle da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e na promoção de crescimento de pimentão, crisântemo e pepino cultivados em hidroponia (10, 11). *B. subtilis* GB03, reconhecido agente de controle biológico, é comercializado no bioproduto Companion[®], para o controle de doenças de parte aérea e radiculares em cultivos convencionais, hidropônicos e orgânicos (3, 6).

O objetivo do trabalho foi avaliar o controle biológico da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e a promoção de crescimento com *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 em alface hidropônica.

MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do controle biológico da podridão radicular e da promoção de crescimento com *P. chlororaphis* 63-28 (Turf Science Laboratories Inc., National City, CA, EUA) e *B. subtilis* GB03 (Companion[®], Growth Products, White Plains, NY, EUA) em alface hidropônica foi realizada em três experimentos (I, II e III). No I, *P. chlororaphis* 63-28 foi aplicada uma ou duas vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas ou não com o patógeno; no II *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) foi aplicado uma ou duas vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas com o patógeno e uma vez nas plantas não inoculadas com o patógeno; e no III *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 foram aplicados duas vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas ou não com o patógeno.

As sementes de alface romana cv. Green Towers MI (Stokes Seeds LTD., Welland, ON, Canadá) foram semeadas em lâ de rocha (2,5 cm x 2,5 cm x 4,0 cm, Grodan, Roermond, Holanda) e irrigadas com água destilada durante 11 dias em câmara de crescimento com o fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes (115 W Branco Frio; GTE, Sylvania Ltd, Canadá), suplementada com lâmpadas incandescentes a $26\pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, as plântulas foram transferidas para cestas plásticas (Homegrown Hydroponics, Breslau, ON) com argila expandida (LECA) utilizada para dar suporte às plantas e irrigadas com solução nutritiva com a condutividade elétrica (CE) de 1,0 mS/cm durante 15 dias. Plantas com 26 dias de desenvolvimento foram acondicionadas em unidades hidropônicas compostas por recipientes de polietileno branco, contendo 475 mL de solução nutritiva (CE=2,0 mS/cm). A preparação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se 1,15g do fertilizante solúvel 7:11:27 (N:P:K + micronutrientes: Plant Products Ltd., Brampton, ON, Canadá) e 0,775g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por litro de água deionizada, sendo o pH da solução nutritiva ajustado para 5,8. A CE e o pH da solução nutritiva foram mensurados com um medidor de pH portátil (Accumet model AP61, Fisher Scientific, Toronto, Canadá). Para se excluir a luz das unidades hidropônicas, a tampa foi coberta com um plástico dupla face (preto-branco), com o lado branco na parte interior. A solução nutritiva, em cada unidade, foi continuamente aerada por bombas de aquário com tubos de plástico (2 mm de diâmetro interno) e repostada quando necessário. Após a inoculação das plantas a temperatura da câmara de crescimento foi ajustada para $30\pm 1^\circ\text{C}$, e a aeração das plantas foi realizada por um período de 8 h por dia. As mudanças na temperatura da câmara de crescimento e na aeração da solução nutritiva foram realizadas para aumentar à suscetibilidade das plantas a podridão radicular.

Multiplicação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e infestação da solução nutritiva com os bioagentes

A multiplicação de *P. chlororaphis* 63-28 foi realizada em meio de cultura líquido TSB (Tryptic Soy Broth) por um período de 48 h em agitação constante a 150 rpm a $22\pm 1^\circ\text{C}$, e posterior centrifugação por 15 min a 2000 g. As células recuperadas foram lavadas duas vezes utilizando-se tampão 0,1 M MgSO_4 por meio da centrifugação a 2000 g por 10 min.

A infestação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se *P. chlororaphis* 63-28 na concentração final de 10^7 ufc/mL e Companion[®] (Growth Products, White Plains, NY, EUA) na concentração final de 5×10^4 ufc/mL de *B. subtilis* GB03 para a primeira aplicação (260 mL de Companion[®] por 1000 L de solução nutritiva) e de 3×10^4 ufc/mL (156 mL de Companion[®] por 1000 L de solução nutritiva), para a segunda aplicação, sendo as doses recomendadas pelo fabricante para o uso em hidroponia.

Produção do inóculo de *Pythium aphanidermatum* e inoculação das plantas

Zoósporos do isolado de *P. aphanidermatum* P6 foram produzidos por meio da técnica adaptada de Rahimian & Banihashemi (17). O patógeno foi cultivado em meio de cultura V8 (100 mL de suco V8, 2 g de CaCO_3 , 16 g de Ágar em 900 mL de água deionizada) em placas de Petri por 48 h na temperatura de 27 °C. Após esse período, metade do conteúdo do meio de cultura com o crescimento do patógeno foi transferido para outra placa, onde nestas placas foram adicionados aproximadamente 20 mL de água deionizada esterilizada. As culturas foram incubadas novamente por 72 h, quando houve nova troca de água. Após a segunda troca de água, as culturas foram incubadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, e após aproximadamente 4 h os zoósporos foram liberados. Os zoósporos liberados foram coletados em beakers e a suspensão utilizada para a inoculação das plantas foi ajustada para 1×10^4 zoósporos/mL. A densidade de zoósporos na suspensão foi estimada por meio da vibração de 5 mL das amostras em microtubos em Vortex (Fisher Scientific, Toronto, Ontario, Canadá) por 30 seg., realizando-se a contagem dos zoósporos em hemacitômetro. Para a inoculação, cada planta foi cuidadosamente posicionada em um becker com o sistema radicular totalmente imerso na suspensão de zoósporos por 30 min. A suspensão de zoósporos foi obtida utilizando-se solução nutritiva com a metade da sua concentração. Os sistemas radiculares das plantas dos tratamentos sem a inoculação com o patógeno foram imersos em solução nutritiva com a metade da sua concentração.

Avaliação dos experimentos

A avaliação da incidência do patógeno foi realizada por meio do plaqueamento de amostras de raízes retiradas ao acaso no final do experimento. Cinco segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, de cada planta, foram plaqueados em meio P5AR

(20 g de Corn Meal Ágar em 1000 mL de água deionizada, acrescido de 250 mg/L de ampicilina e 10 mg/L de rifampicina após a autoclavagem) e incubados a 27°C por 72 h. A incidência do patógeno nas raízes foi avaliada por meio da observação de estruturas de reprodução do patógeno em microscópio ótico.

As análises não destrutivas das plantas foram realizadas por meio da avaliação do crescimento foliar e do teor de clorofila foliar. As análises destrutivas foram realizadas por meio da pesagem da massa das plantas. A avaliação da expansão da área foliar foi realizada marcando-se uma folha jovem por repetição de cada tratamento e realizando-se o desenho dessa mesma folha em transparência durante o período após a inoculação das plantas com o patógeno. No final do experimento realizou-se a conversão do peso do desenho da folha em área foliar. O cálculo da área abaixo da curva de crescimento das folhas foi realizado por meio da fórmula descrita por Shaner & Finney (18). O conteúdo de clorofila nas folhas foi avaliado no final do experimento por meio do equipamento Chlorophyll Meter Minolta SPAD-502 determinando-se a média do pigmento em quatro quadrantes por folha, sendo avaliadas 5 folhas por repetição. Nas análises destrutivas, o sistema aéreo foi separado do sistema radicular e imediatamente pesado. Todas as raízes do exterior da lâ de rocha foram removidas, secas e pesadas para determinar a massa fresca. Para a medida de massa seca, os sistemas aéreos e radiculares foram secos a 80°C por 48 h em estufa de secagem.

Análises estatísticas

Para a análise dos resultados foi utilizado o pacote estatísticos SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de LSD. Os experimentos foram arrançados em delineamento inteiramente casualizado. O experimento I, utilizando *P. chlororaphis* 63-28, foi arrançado com cinco blocos, no experimento II, utilizando *B. subtilis* GB03, foi arrançado com sete blocos; e o experimento III, utilizando *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03, foi arrançado com 5 blocos, sendo uma repetição de cada tratamento por bloco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

P. aphanidermatum causou subdesenvolvimento das plantas de alface hidropônica (Tabelas 1 e 2). Além do sintoma clássico de podridão radicular, plantas parasitadas por espécies de *Pythium* podem apresentar murcha, diminuição da produção, clorose, escurecimento vascular e subdesenvolvimento (11, 20, 23), como o observado no presente trabalho. Subdesenvolvimento em alface hidropônica parasitada por *Pythium* spp. também foi verificado por Corrêa & Bettiol (2) e Utkhede *et al.* (21). O subdesenvolvimento é expresso nas plantas onde o parasitismo de *Pythium* encontra-se na fase biotrófica, sem a exibição de sintomas de podridão e murcha, sendo também denominada de infecção subclínica (19). Os fatores que ocasionam a transição da fase biotrófica para a necrotrófica ainda não estão esclarecidos. Contudo, estudos apontam para a existência de um elicitador denominado PaNie (*Pythium aphanidermatum* necrosis - inducing elicitor), responsável pelo desencadeamento do escurecimento radicular (22). Devido à elevada densidade de plantas utilizadas em cultivos hidropônicos e a não exibição de sintomas de murcha e podridão radicular, muitas vezes o produtor não detecta a doença no cultivo, resultando em perdas em massa até que ocorra e expressão da doença necrotroficamente. Diminuições na ordem de 20% foram verificadas na massa das plantas inoculadas com o patógeno (Tabelas 1 e 2), sendo essa diminuição relacionada diretamente com a diminuição na receita do produtor de alface hidropônica que comercializa o seu produto por massa.

Diferenças entre os tratamentos não foram verificadas com relação a expansão foliar de alface hidropônica (Figuras 1, 2 e 3) e entre as áreas abaixo da curva de crescimento foliar (Tabela 3).

A adição de *P. chlororaphis* 63-28 causou efeitos positivos no número de folhas por planta naquelas não inoculadas com o patógeno (Tabela 4) e na massa das plantas (Tabela 1), apesar dos valores não diferirem estatisticamente das suas testemunhas. *P. chlororaphis* 63-28 tem se mostrado um eficiente agente de controle biológico e promotor de crescimento de plantas cultivadas em hidroponia (8, 9, 10). McCullagh *et al.* (10) verificaram maior produção das plantas de pepino hidropônicas inoculadas com *P.*

aphanidermatum e tratadas com *P. chlororaphis* 63-28 em condições de elevada severidade da doença, em relação as plantas não tratadas com a bactéria. A aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 ou de *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 em cultivo comercial de pepino hidropônico suprimiu *Pythium* nas raízes das plantas e promoveu o crescimento do sistema aéreo das plantas (8). Em crisântemo hidropônico a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 ou *P. aureofaciens* TX-1 suprimiu a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* em temperaturas moderadas (22-25°C) ou elevadas (32 °C) (9). Os mecanismos de ação conhecidos pela bactéria são a produção de hormônios de crescimento, antibióticos, sideróforos e competição por espaço e nutrientes (3, 15).

A adição de *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) duas vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas com o patógeno aumentou a massa das plantas (Tabela 2) e quando aplicado duas vezes na solução nutritiva de alface hidropônica não inoculada com o patógeno aumentou o teor de clorofila das plantas (Tabela 4). *B. subtilis* GB03 tem como mecanismos de ação a produção de antibióticos e a competição por espaço e nutrientes com patógenos. O registro do produto Companion[®], à base de *B. subtilis* GB03, é para o controle de doenças causadas por *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp. em diversas culturas, incluindo cultivos hidropônicos, convencionais e orgânicos (6). Efeitos positivos no desenvolvimento de alface hidropônica com a adição de *B. subtilis* na solução nutritiva também foram verificados por Corrêa & Bettiol (2) e Utkhede *et al.* (21). Utkhede *et al.* (21) adicionaram o bioproduto Boost (*B. subtilis* BACT-O) na concentração final de 1×10^6 ufc/mL de solução nutritiva do cultivo de alface e verificaram a promoção de crescimento das plantas inoculadas com *P. aphanidermatum* em 21,5 a 28,4% quando comparado à testemunha inoculada. A introdução na solução nutritiva com o meio fermentado por *B. subtilis* AP-3 nas concentrações de 0,1% e 1% de solução nutritiva, ou com as células bacterianas na concentração final de 10^4 células/mL de solução nutritiva promoveu o crescimento de alface hidropônica, sendo o a promoção de 17% quando utilizou-se as células bacterianas (2).

Mais estudos com relação à capacidade rizosférica, períodos de aplicação e concentrações ideais de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 devem ser realizados em

alface hidropônica para a validação da capacidade de controle biológico e promoção de crescimento dos agentes de biocontrole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHATTERTON, S.; SUTTON, J. C.; BOLAND, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. **Biological control**, San Diego, v.30, n.2, p.360-373, 2004.
2. CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W. 2009. Controle biológico da podridão de raízes causada por *Pythium* spp. em cultivos hidropônicos.. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Série Documentos, 2009, 26 p.
3. EPA - United States Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006478.htm. Acesso em: 15 out. 2009.
4. FAQUIN, V.; FURLANI, P.R. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.200 201, p. 99-104, 1999.
5. FURLANI, P.R. *Pythium* em sistemas hidropônicos – danos e perspectivas para o controle: Principais sistemas hidropônicos em operação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34 (suplemento), p.S146-147, 2008.
6. GROWTH PRODUCTS. *New bioproducts*. Disponível em: <http://www.growthproducts.com/pages/horticulture.asp?tables=featured&product=10>. Acesso em: 25 mar. 2009.
7. KHAN, A.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, n.6, p.615-630, 2003.
8. LIU, W.; SUTTON, J.C. Effectiveness of microbial agents to protect *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. **B&C Tests**, v. 18, p.1-2, 2003. Disponível em: <www.apsnet.org/online/BCtests/reports/2003/V023.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2007.

9. LIU, W.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. **Phytoparasitica**, Rehovot, v.35, n.2, p.159-178, 2007.
10. MCCULLAGH, M.; UTKHEDE, R.; MENZIES, J.G.; PUNJA, Z.K.; PAULITZ, T.C. Evaluation of growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v.102, n.8, p.747-755. 1996.
11. OWEN-GOING, T.N.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI. Relationship of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, n. 2, p.155-167, 2003.
12. PAULITZ, T. Biological control of root rot pathogens in soilless and hydroponic systems. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.2, p.193-196, 1997.
13. PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.
14. PAULITZ, T.C.; ZHOU, T.; RANKIN, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. **Biological Control**, San Diego, v.2, p.226-237, 1992.
15. PAULITZ, T.; NOWAC-THOMPSON, B.; GAMARD, P.; TSANG, E.; LOPER, J. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. **Journal of Chemical Ecology**, The Netherlands, v.26, n.6, p.1515-1524, 2000.
16. PUNJA, Z.K.; YIP, R. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.25, n.4, p.411-417, 2003.
17. RAHIMIAN, M.K.; BANIHASHEMI, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucumber seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Report**, St. Louis, v.63, n.8, p.658-661, 1979.
18. SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1056, 1977.

19. STANGHELLINI, M.E.; KRONLAND, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder roots by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Louis, v.70, n.11, p.1053-1056, 1986.
20. SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOING, T.N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J.C.; BENCHIMOL, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n. 4, p.307-321.2006.
21. UTKHEDE, R.S.; LÉVESQUE, C.A.; DINH, D. 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, n. 2, p.138-144, 2000.
22. VEIT, S.; WORLE, J.M.; NURNBERGER, T.; KOCH, W.; SEITZ, H.U. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 127, n.3, p.832-841, 2001.
23. ZHENG, J.; SUTTON, J.C.; YU, HI. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, n.4, p.368-379, 2000.
24. ZINNEN, T.M. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. **Plant Disease**, St. Louis, v.72, n.2, p.96-99, 1988.

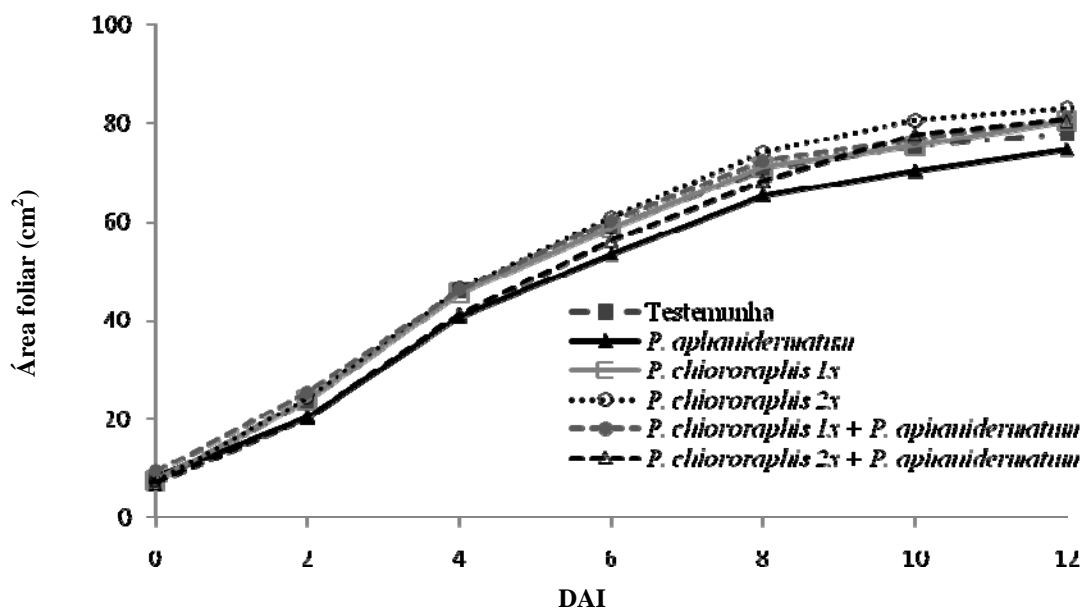


Figura 1. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a aplicação na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

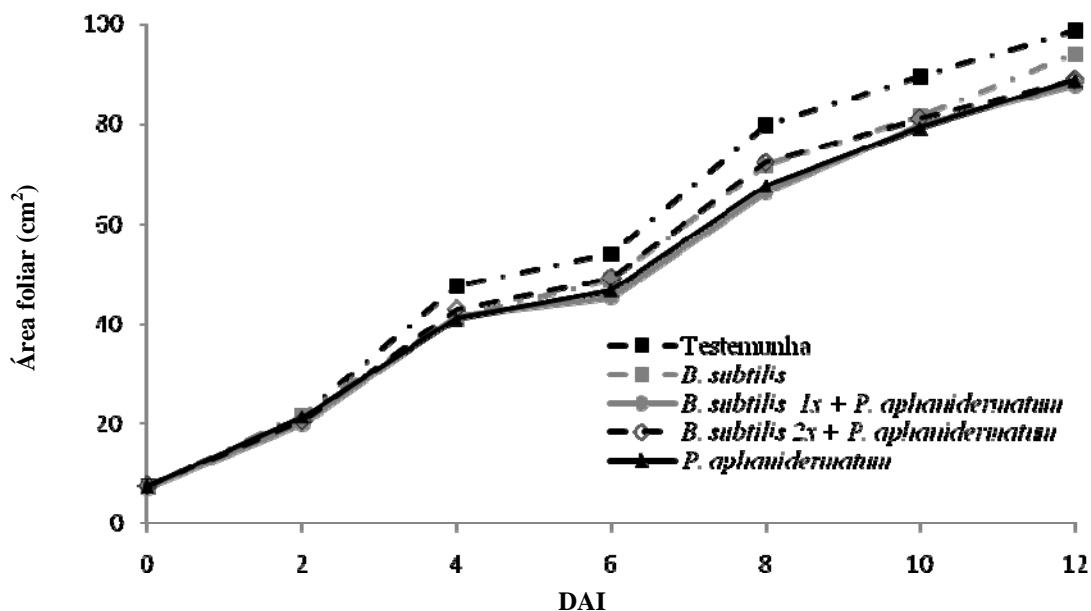


Figura 2. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a introdução na solução nutritiva ou não de *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

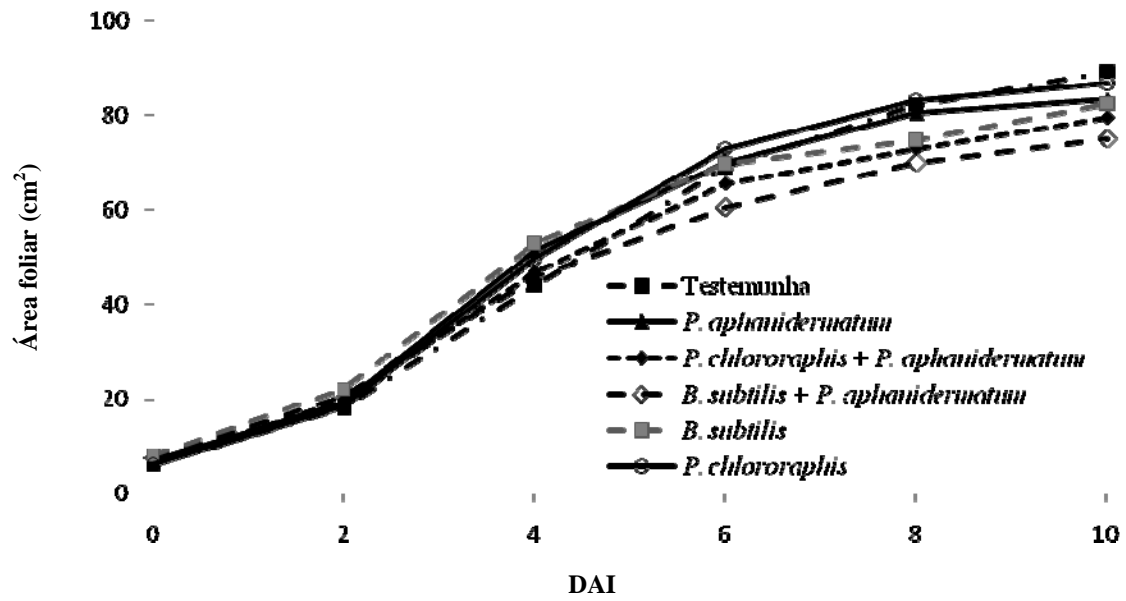


Figura 3. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a aplicação na solução nutritiva ou não com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

Tabela 1. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 na solução nutritiva de plantas de alface, antes e/ou no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa das plantas.

Tratamento	Massa fresca do sistema aéreo (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa fresca total (g)
Testemunha	147,83 a *	7,51 a	155,34 a
<i>P. chlororaphis</i> 1x	140,41 ab	7,80 a	148,21 ab
<i>P. chlororaphis</i> 2x	143,80 ab	7,93 a	151,74 a
<i>P. chlororaphis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	135,83 ab	5,07 b	140,90 ab
<i>P. chlororaphis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	134,59 ab	4,83 b	139,42 ab
<i>P. aphanidermatum</i>	120,38 b	4,33 b	124,35 b
CV	16,52	26,24	16,61
	Massa seca do sistema aéreo (g)	Massa seca do sistema radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha	9,25 **	0,57 a	9,82
<i>P. chlororaphis</i> 1x	9,19	0,65 a	9,78
<i>P. chlororaphis</i> 2x	9,15	0,58 a	9,73
<i>P. chlororaphis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	9,00	0,37 b	9,40
<i>P. chlororaphis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	9,03	0,37 b	9,40
<i>P. aphanidermatum</i>	7,79	0,36 b	8,15
CV	18,14	37,47	18,83

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. **Dados sem letra não foram significativos pelo teste F.

Tabela 2. Efeito da introdução de *Bacillus subtilis* GB03 (Companion[®]) na solução nutritiva de plantas de alface hidropônica, aos sete dias antes e/ou no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa seca das plantas, aos 14 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamento	Massa seca do sistema aéreo (g)	Massa seca do sistema radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha	9,63 a *	0,56**	10,20 a
<i>B. subtilis</i>	8,88 ab	0,47	9,35 ab
<i>B. subtilis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	7,71 c	0,38	8,10 c
<i>B. subtilis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	8,24 bc	0,41	8,65 bc
<i>P. aphanidermatum</i>	7,78 c	0,35	8,13 c
CV	10,87	35,24	11,50

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. **Dados sem letra não foram significativos pelo teste F.

Tabela 3. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®) na solução nutritiva de alface hidropônica, sobre a área abaixo da curva de crescimento foliar.

Tratamento	Área abaixo da curva de crescimento foliar
Experimento I	
Testemunha	634,84 *
<i>P. chlororaphis</i> 1x	637,69
<i>P. chlororaphis</i> 2x	663,05
<i>P. chlororaphis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	652,38
<i>P. chlororaphis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	597,93
<i>P. aphanidermatum</i>	583,69
CV	14,50
Experimento II	
Testemunha	691,64
<i>B. subtilis</i>	632,54
<i>B. subtilis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	598,55
<i>B. subtilis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	628,13
<i>P. aphanidermatum</i>	608,42
CV	10,79
Experimento III	
Testemunha	522,44
<i>P. chlororaphis</i>	541,46
<i>B. subtilis</i>	528,78
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	495,68
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	475,67
<i>P. aphanidermatum</i>	532,22
CV	17,84

* Dados não foram significativos pelo teste F.

Tabela 4. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®), sete dias antes e/ou no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, na solução nutritiva de alface hidropônica, sobre o valor médio de clorofila foliar das folhas e o número de folhas de alface, após a inoculação das plantas com o patógeno.

Tratamento	Clorofila foliar (unidade SPAD)	Número de folhas
Experimento I		
Testemunha	44,4 *	31,57 ab **
<i>P. chlororaphis</i> 1x	45	32,71 a
<i>P. chlororaphis</i> 2x	43,8	30,7 ab
<i>P. chlororaphis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	47	31,43 ab
<i>P. chlororaphis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	46,7	31,43 ab
<i>P. aphanidermatum</i>	45,9	29,43 b
CV	5,31	9,14
Experimento II		
Testemunha	40,9 a	32 a
<i>B. subtilis</i>	39,9 a	30,37 a
<i>B. subtilis</i> 1x + <i>P. aphanidermatum</i>	39,8 a	28,25 b
<i>B. subtilis</i> 2x + <i>P. aphanidermatum</i>	41,3 a	27,75 b
<i>P. aphanidermatum</i>	39,4 a	27,62 b
CV	4,57	6,61
Experimento III		
Testemunha	48 ab	27,83
<i>P. chlororaphis</i>	47,34 abc	29,67
<i>B. subtilis</i>	49,23 a	29,50
<i>P. chlororaphis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	45 c	30,33
<i>B. subtilis</i> + <i>P. aphanidermatum</i>	46,65 bc	28,67
<i>P. aphanidermatum</i>	46,65 bc	28,83
CV	5,27	10,94

* Dados não foram significativos pelo teste F. ** Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%.

CAPÍTULO 4

FORMULAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ALFACE HIDROPÔNICA

Formulação de *Pseudomonas* spp. e promoção de crescimento de alface hidropônica

E.B. Corrêa¹, J.C. Sutton e W. Bettiol

Resumo: O desenvolvimento de formulações que garantam ampla vida-de-prateleira e preservação das características fisiológicas de espécies de *Pseudomonas* é fator chave para a utilização desse importante gênero de agentes de biocontrole e promotores de crescimento na agricultura. O objetivo do trabalho foi avaliar a vida de prateleira de formulações de *Pseudomonas* spp. e a viabilidade das células bacterianas após armazenamento. Primeiramente foi avaliada a formulação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em fibra de coco, talco e turfa, com ou sem a adição de carboximetilcelulose ou goma xantana aos substratos. Um segundo experimento foi realizado com a formulação de *P. chlororaphis* 63-28 e *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 em fibra de coco com 25%, 45% e 75% de umidade. A sobrevivência de *P. chlororaphis* 63-28 em meio líquido foi avaliada em tampão sulfato de magnésio, água deionizada e óleo de canola. As temperaturas de 22 ± 1 °C e 3 ± 1 °C foram utilizadas para todos os ensaios. A capacidade de promoção de crescimento de células de *P. chlororaphis* 63-28 preservadas por 140 dias em fibra de coco a 3 ± 1 °C ou cultivadas por dois dias em meio de cultura foram avaliadas em alface hidropônica. Formulações de *Pseudomonas* spp. armazenadas a 3 ± 1 °C propiciaram maior vida-de-prateleira, quando comparadas com as armazenadas a 22 ± 1 °C. A formulação em fibra de coco com umidade entre 75-80% proporcionou a maior vida-de-prateleira. A adição de carboximetilcelulose ou goma xantana não aumentou a vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28. A população de *P. chlororaphis* 63-28 manteve-se na mesma unidade $\log \text{ufc mL}^{-1}$ de substrato por um período de 32 semanas em fibra de coco a 80% de umidade e por 120 dias (período avaliado) em fibra de coco a 75% de umidade a 3 ± 1 °C. *P. aureofaciens* TX-1 manteve-se na mesma unidade $\log \text{ufc mL}^{-1}$ em fibra de coco com a umidade de 75% a 3 ± 1 °C por um período de 60 dias. A utilização de água deionizada e tampão proporcionou melhor sobrevivência bacteriana quando comparada com o óleo de canola. A adição de células de *P. chlororaphis* 63-28 preservadas por 140 dias promoveu o crescimento de alface hidropônica. Conclui-se que fibra de coco pode ser utilizada na formulação de *Pseudomonas* spp. em escala comercial.

Palavras chave: formulação, *Pseudomonas*, promoção de crescimento.

***Pseudomonas* spp. formulation and hydroponic lettuce growth promotion**

Abstract: The development of the formulations that allow a long term shelf life and maintain the physiological viability of *Pseudomonas* species is a key factor for commercial use of this important genus of biological control agents and plant growth promoting bacteria in agriculture. The aim of this work was to evaluate the shelf life formulations of *Pseudomonas* spp., and the viability of the bacteria cells storage. In an initial experiment *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 was formulated with coconut fibre, talc, and peat, with and without carboxymethylcellulose or xanthan gum. In a second experiment *P. chlororaphis* 63-28 and *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 were formulated in coconut fibre with water contents (v:v) of 25%, 45%, and 75%. Survival of *P. chlororaphis* 63-28 was also evaluated in magnesium buffer, deionized water, and canola oil. Formulations were stored at 22±1 °C and at 3±1 °C in all experiments. The effectiveness of the coconut fibre formulation of *P. chlororaphis* 63-28 in promoting growth of lettuce following 140 days of storage at 3±1 °C was compared with that of the agent grown for two days in media. The shelf life of *Pseudomonas* spp. was longer at 3±1°C compared to 22±1°C and longer in coconut fibre formulations contents when the water content was about 75-80% than at the lower water contents. The addition carboxymethylcellulose or xanthan gum to the carriers did not improve the shelf life of *P. chlororaphis* 63-28. The population density of *P. chlororaphis* 63-28 stayed in the same unit log ufc mL⁻¹ of carrier for 32 weeks in coconut fibre with 80% of water content and for 120 days (maximum time evaluated) in coconut fibre with 75% of water content at 3±1°C. *P. aureofaciens* TX-1 kept in the same log ufc mL⁻¹ unit in coconut fibre with 75% of water content at 3±1°C for 60 days. *P. chlororaphis* 63-28 survived longer in deionized water and buffer compared with the canola oil. The addition of *P. chlororaphis* 63-28 cells after storage for 140 days at 3±1°C in coconut fibre improved the hydroponic lettuce growth. We conclude that coconut fibre used as a carrier has substantial value for maintaining viability and activity of *Pseudomonas* spp., and so may facilitate commercialization of these bacteria for use in crops.

Key words: formulation, *Pseudomonas*, growth promotion.

E.B. Corrêa.¹ Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP, Department of Plant Protection, Km 3 Alcides Soares Rd., Botucatu, SP, 18610-307, Brazil

J.C. Sutton. University of Guelph, Department of Environmental Biology, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

W. Bettiol. Embrapa Meio Ambiente, SP 340 Rd., Jaguariúna, SP, 13820-000, Brazil¹

Autor para a correspondência (e-mail: elidabcorrea@yahoo.com.br).

Introdução

Pseudomonas spp. possuem alta efetividade no controle de doenças de plantas da parte aérea e do sistema radicular em diferentes tipos de cultivos (Khan et al. 2003; Nakkeerran et al. 2006; Stockwell e Stack, 2007). Esse gênero tem contribuído largamente para o entendimento dos mecanismos envolvidos na supressão de doenças de plantas, sendo um grupo de bactérias com elevado potencial para o desenvolvimento de produtos comerciais (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Bakker et al. 2007; Kloepper et al. 1988). Entretanto, *Pseudomonas* spp. são bactérias Gram-negativas, não esporogênicas e sensíveis à condições adversas, tornando-as de difícil formulação e consequentemente aplicação comercial (Paulitz e Bélanger, 2001). Devido a essas razões, os produtos comercializados com bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* são mais frequentes no mercado quando comparados com os produtos formulados com espécies do gênero *Pseudomonas*. Espécies de *Bacillus* possuem a vantagem de produzirem esporos de resistência, denominados endósporos, que facilitam o desenvolvimento de produtos comerciais (Haas e Défago, 2005). Como exemplo do maior número de bactérias Gram-positivas utilizadas na agricultura, pode ser citado o número de microrganismos registrados como biopesticidas na “Environmental Protection Agency” (EPA) dos Estados Unidos de 1996 até 2008. Dentre os isolados bacterianos listados existem 16 isolados de *Bacillus thuringiensis*, um isolado de *Agrobacterium radiobacter*, dois isolados de *Bacillus subtilis*, um isolado de *Bacillus licheniformes*, um isolado de *Bacillus cereus*, dois isolados de *Bacillus pumilus*, um isolado de *Streptomyces lydicus*, um isolado de *Pseudomonas chlororaphis*, um isolado de *Pseudomonas aureofaciens* e dois isolados de *Pantoea agglomerans*, totalizando 23 isolados Gram-positivos e 5 isolados Gram-negativos (EPA, 2009).

A utilização de *Pseudomonas* spp. em escala comercial no controle de doenças e na promoção de crescimento de plantas depende do desenvolvimento de formulações que

possibilitem a sua aplicação no sítio de infecção do patógeno e/ou em locais que possibilitem a expressão dos mecanismos de controle de doenças e de promoção de crescimento no ambiente, além de uma vida-de-prateleira compatível com a distribuição e logística do bioproduto (Vidhyasekaran e Muthamilan, 1995). Vidhyasekaran e Muthamilan (1999) desenvolveram formulação de *Pseudomonas fluorescens* Pf1 em talco e trataram as sementes, as raízes e a folhagem de arroz, além da infestação do solo de cultivo de arroz. A aplicação da bactéria veiculada ao talco controlou a queima-da-bainha causada por *Rhizoctonia solani* e aumentou a produtividade das plantas, sendo mais eficiente do que a aplicação do fungicida utilizado regularmente no controle da doença. Nakkeeran et al. (2006) conservaram células de *B. subtilis* BSCBE4 e *P. chlororaphis* PA23 em turfa e talco por 180 dias a $28\pm 2^\circ\text{C}$. A aplicação dos isolados no tratamento de sementes formulados em turfa promoveu o crescimento das plantas de pimenta e induziu a produção de enzimas relacionadas com a indução de resistência. O tratamento de sementes de grão-de-bico com a formulação de *P. fluorescens* em talco proporcionou a sobrevivência da bactéria nas sementes por 180 dias e controlou a murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, além de aumentar a produção das plantas (Vidhyasekaran e Muthamilan, 1995).

Pseudomonas chlororaphis 63-28 e *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 são registradas como biopesticidas na EPA (EPA, 2009) e são reconhecidos agentes de biocontrole de doenças de plantas (Chatterton et al. 2004; Khan et al. 2003; Liu et al. 2003). *P. chlororaphis* 63-28 é um eficiente colonizador radicular e tem a capacidade de produzir antibióticos, compostos promotores de crescimento e de induzir resistência nas plantas (EPA, 2009; Paulitz e Bélanger, 2001). O seu registro na EPA é para o controle de doenças causadas por patógenos veiculados pelo solo, agentes causais de podridões radiculares e murchas (EPA, 2009). *P. aureofaciens* TX-1 é registrada para o controle de doenças em campos de golfe causadas por *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Colletotrichum graminicola* e *Microdochium nivale*. Nos Estados Unidos é comercializado o bioproduto Spot-Less Biofungicide® (Eco Soil Systems, San Diego, CA, EUA) que é composto pelo sistema de fermentação automática “BioJect Automatic Fermentation System”. Células de *P. aureofaciens* TX-1 são cultivadas por aproximadamente 12h nas instalações do campo de golfe no sistema de fermentação, seguida de aplicação por meio do sistema de irrigação (EPA, 2009).

Devido à dificuldade de formulação de *Pseudomonas* spp. e da necessidade de longos períodos de vida-de-prateleira para a comercialização de um bioproduto, o objetivo do trabalho foi avaliar a formulação e a vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28 e *P. aureofaciens* TX-1 nas temperaturas de $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$, e o efeito de células de *P. chlororaphis* 63-28 preservadas por 140 dias em fibra de coco sobre o crescimento de alface hidropônica.

Material e Métodos

Multiplicação das bactérias

Os isolados de *P. chlororaphis* 63-28 e de *P. aureofaciens* TX-1 (Eco Soil Systems, San Diego, CA, EUA) foram utilizados para o desenvolvimento das formulações. *Pseudomonas* spp. foram cultivadas em meio “Tryptic Soy Broth” (TSB) por 48 h em agitador a 150 rpm sob a temperatura de $22\pm 1^\circ\text{C}$. Após 48 h a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2000 g por 15 min, sendo as células ressuspendidas e lavadas por meio da centrifugação a 2000 g por 10 min em tampão MgSO_4 0,1M.

Formulação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em fibra de coco, talco e turfa

A avaliação da vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28 foi realizada utilizando-se fibra de coco, talco e turfa, com ou sem a adição de carboximetilcelulose (BDH Chemicals Ltd Poole England, baixa viscosidade) ou goma xantana (Bob's Red Mill). A turfa e a fibra de coco foram peneiradas em peneiras com a abertura de 2 mm. O volume de 500 mL dos materiais foi acondicionado em sacos de poliestireno com uma abertura para troca de oxigênio e autoclavados duas vezes por 45 min a 120°C . Após autoclavagem, 50 mL de suspensões bacterianas contendo 5×10^9 unidades formadoras de colônia (ufc) mL^{-1} em tampão MgSO_4 0,1M, com os aditivos carboximetilcelulose (1% do volume de suspensão) ou goma xantana (0,1% do volume de suspensão) ou não, foram adicionadas nos materiais contidos nos sacos de poliestireno. As formulações foram mantidas a $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 32 semanas. A umidade nos produtos formulados foi de 8% para o talco, 40% para a turfa e 80% para a fibra de coco. Amostras foram retiradas de cada saco

em diferentes intervalos de tempo para a avaliação da população bacteriana por meio do plaqueamento das suspensões em meio TSB acrescido de Ágar, utilizando o método de diluição seriada.

Efeito da umidade sobre a vida-de-prateleira de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 formuladas em fibra de coco

Para a avaliação da vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28 e *P. aureofaciens* TX-1 em fibra de coco (Optimum Hydroponix, Canadá) peneirou-se a fibra em peneira com a abertura de 425 μm e neutralizou-se o pH (7) com CaCO_3 . O volume de 90 mL de fibra de coco foi adicionado em sacos de poliestireno compostos de aberturas para a troca de oxigênio. A esterilização do substrato foi realizada por meio da autoclavagem por 3 dias alternados a 120°C. Após autoclavagem, as suspensões bacterianas foram adicionadas à fibra de coco. As umidades da fibra de coco foram ajustadas para 25%, 45% e 75%. Os sacos de polipropileno contendo a fibra de coco com as suspensões bacterianas foram acondicionados a $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$ durante 120 dias. Avaliações mensais foram realizadas para a avaliação da população bacteriana por meio do plaqueamento em meio TSB acrescido de Ágar, e da umidade dos substratos.

Formulação de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em água, óleo de canola e tampão de sulfato de magnésio

A vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28 em meio líquido foi avaliada em água, óleo de canola (Canola Harvest, Canbra Foods Ltd, Canadá) e tampão de MgSO_4 0,1M por meio da adição de suspensões bacterianas (1×10^{10} ufc mL^{-1}) na proporção de 1% em 30 mL dos líquidos contidos em tubos de plástico protegidos contra a incidência de luz com papel alumínio. A água, o óleo de canola e o tampão foram autoclavados anteriormente à adição das suspensões bacterianas. Os tubos de plástico contendo as suspensões foram acondicionados a $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$, durante um período de 120 dias, onde foram avaliadas as populações bacterianas por meio do plaqueamento das suspensões em meio TSB acrescido de Ágar.

Promoção de crescimento de alface hidropônica por *P. chlororaphis* 63-28

Sementes de alface romana (*Lactuca sativa* L.) cultivar Green Towers MI (Stokes Seeds Ltd., Welland, ON, Canadá) foram semeadas em lã de rocha e mantidas em bandejas plásticas em câmara de crescimento a 26 °C. Durante 12 dias as plantas foram irrigadas com água deionizada, após esse período as plantas foram transferidas para cestas plásticas contendo argila expandida (LECA) e receberam solução nutritiva com a condutividade elétrica (CE) de 1 mS/cm, por mais 12 dias. Plantas com 24 dias de desenvolvimento foram transferidas para unidades hidropônicas compostas por recipientes de polietileno branco de 475 mL, com solução nutritiva (CE=2 mS/cm). Para se excluir a luz, a tampa foi coberta com plástico dupla face (preto-branco). A preparação da solução nutritiva com CE=2,0 mS/cm foi realizada adicionando-se 1,15g do fertilizante solúvel 7:11:27 (NPK + micronutrientes: Plant Products Ltd., Brampton, ON, Canadá) e 0,775g Ca(NO₃)₂ por litro de água deionizada, e o pH ajustado para 5,8 e mensurado com um medidor de pH portátil (Accumet model AP61, Fisher Scientific, Toronto, Canadá). A solução nutritiva em cada unidade foi continuamente aerada por bombas de aquário com tubos de plástico (2 mm de diâmetro interno) e reposta quando necessário. O fotoperíodo foi de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes (115 W Branco Frio; GTE, Sylvania Ltd, Canadá), suplementada com lâmpadas incandescentes. Plantas com 25 dias foram infestadas com células de *P. chlororaphis* 63-28 preservadas por 140 dias a 3±1°C em fibra de coco ou com células da bactéria cultivadas por 2 dias em meio de cultura TSB. A infestação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se suspensões preparadas em tampão 0,1M MgSO₄ na concentração final de 10⁷ ufc mL⁻¹ de solução nutritiva. As células preservadas em fibra de coco foram recuperadas por meio da adição de tampão 0,1 M MgSO₄ e agitação em Vortex (Fisher Scietific, Toronto, Ontário, Canadá) por 40 segundos. As suspensões foram filtradas três vezes em gaze autoclavada para eliminar o excesso de fibra na suspensão e utilizadas para a infestação da solução nutritiva.

Após 21 dias da infestação da solução nutritiva com as populações bacterianas foram realizadas as análises destrutivas das plantas. A avaliação da expansão da área foliar foi realizada marcando-se uma folha jovem por repetição de cada tratamento e realizando-se o desenho dessa mesma folha em transparência durante o período após a infestação das

plantas em dias alternados. A taxa de crescimento foliar foi realizada através da fórmula: $TXCF = \frac{C_{n+1} - C_n}{T_{n+1} - T_n}$, onde C é o valor de crescimento foliar, n é o dia da avaliação e T é o tempo em que a avaliação do crescimento foi realizada. O cálculo da área abaixo da curva de crescimento das folhas e da taxa de crescimento foliar foi realizado por meio da fórmula descrita por Shaner & Finney (1987). Nas análises destrutivas o sistema aéreo foi separado do sistema radicular, determinando-se a massa fresca das plantas. Todas as raízes do exterior da lâ de rocha foram removidas, secas e pesadas para determinar a massa fresca. Para a medida de massa seca, os sistemas aéreos e radiculares foram secos a 80°C por 48 h em estufa de secagem.

Análise estatística

Os experimentos de formulação e vida-de-prateleira de *Pseudomonas* spp. foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo os dados transformados em \log_{10} antes da análise estatística. A área abaixo da curva de sobrevivência bacteriana foi calculada pela fórmula descrita por Shaner & Finney (1987). O experimento de promoção de crescimento de alface hidropônica foi arranjado em blocos casualizados, com uma repetição por tratamento. Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste LSD utilizando o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Resultados

Avaliação da vida-de-prateleira de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em fibra de coco, talco e turfa

Maior vida-de-prateleira de *P. chlororaphis* 63-28 em fibra de coco, com ou sem a adição dos aditivos carboximetilcelulose ou goma xantana, foi verificada a $3 \pm 1^\circ\text{C}$, quando comparada com a vida-de-prateleira das formulações armazenadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 1 e Tabela 1). A adição de carboximetilcelulose ou goma xantana não proporcionou aumento da sobrevivência bacteriana, independente da temperatura utilizada, sendo que as áreas abaixo da curva de sobrevivência bacteriana não diferiram entre si, pelo teste F (Tabela 1).

As formulações da bactéria em turfa e talco não propiciaram a manutenção da sobrevivência da bactéria em elevadas populações, sendo que decaíram três unidades log ufc mL⁻¹ após a sua aplicação nos substratos (dados não mostrados).

Avaliação da vida-de-prateleira de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 em fibra de coco com diferentes umidades

A temperatura de 3±1°C foi mais eficiente na conservação da vida-de-prateleira de *Pseudomonas* spp. quando comparada com a temperatura de 22±1°C para os tratamentos fibra de coco com 25% e 75% de umidade, para *P. chlororaphis* 63-28; e para os tratamentos com fibra de coco a 25% e 45% de umidade, para *P. aureofaciens* TX-1. O tratamento fibra de coco com 45% de umidade com *P. chlororaphis* 63-28 e o tratamento fibra de coco com 75% de umidade com *P. aureofaciens* TX-1, não diferenciaram quanto a temperatura (Figura 2 e Tabela 2).

Para *P. chlororaphis* 63-28, o tratamento fibra de coco com 75% de umidade proporcionou a melhor sobrevivência bacteriana na temperatura de 3±1°C, não diferindo do tratamento fibra de coco com 45% de umidade na temperatura de 22±1°C (Figura 2 CD, Tabela 2). Os tratamentos com a fibra de coco com as maiores umidades 75% e 45% proporcionaram maior vida-de-prateleira da bactéria, quando comparado com o tratamento fibra de coco com 25% de umidade, independentemente da temperatura testada (Tabela 2).

A sobrevivência de *P. aureofaciens* TX-1 foi superior nos tratamentos fibra de coco com 45% e 75% de umidade, não diferenciando entre si, independentemente da temperatura; quando comparado com o tratamento com fibra de coco com 25% de umidade (Figura 2 AB, Tabela 2).

Avaliação da vida-de-prateleira de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em água, óleo de canola e tampão de sulfato de magnésio

A temperatura de 3±1°C proporcionou melhor sobrevivência de *P. chlororaphis* 63-28 do que a temperatura de 22±1°C, independentemente da suspensão utilizada para a conservação da bactéria (Figura 3 e Tabela 3). A utilização de água e tampão proporcionou melhor sobrevivência bacteriana quando comparada com o óleo de canola (Figura 3 e

Tabela 3). A sobrevivência bacteriana não diferenciou em água ou tampão sulfato de magnésio, independentemente da temperatura utilizada (Figura 3 e Tabela 3).

Promoção de crescimento de alface hidropônica por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28

Não foram verificadas diferenças com relação ao crescimento foliar entre os tratamentos (Figura 4). Os dados na Figura 5 demonstram maior tendência de taxa de crescimento foliar nas plantas de alface infestadas com os isolados bacterianos. Picos de crescimento foliar foram verificados aos dois e cinco dias após a infestação da solução nutritiva com *P. chlororaphis* 63-28 (formulada em fibra de coco e com 140 dias de armazenamento) ou sem a infestação com as células bacterianas, e aos dois, quatro e seis dias após a infestação da solução nutritiva com *P. chlororaphis* 63-28 (multiplicada por 2 dias e utilizada sem formulação) (Figura 5). No entanto, os valores das áreas abaixo das curvas de crescimento e das taxas de crescimento foliares não foram significativos pelo teste F (Tabela 1).

A infestação da solução nutritiva com *P. chlororaphis* preservada em fibra de coco por 140 dias promoveu o desenvolvimento do sistema aéreo de alface hidropônica, diferindo estatisticamente da testemunha sem inoculação (Tabela 2). A utilização de células da bactéria cultivadas em TSB por dois dias promoveu o desenvolvimento do sistema aéreo das plantas, mas a diferença não foi estatisticamente significativa do tratamento testemunha sem a infestação com as bactérias (Tabela 2). Os dados de massa do sistema radicular não diferiram pelo teste F (Tabela 2).

Discussão

Formulações de espécies de *Pseudomonas* com substratos à base de talco e turfa foram sugeridas por Vidhyasekaran e Muthamilan (1995), Krishnamurthy e Gnanamanickan (1998), Wiyono et al. (2008), Kloepper e Schroth (1981), Nakkeeran et al. (2006), Vidhyasekaran e Muthamilan (1999) e Vidhyasekaran et al. (1997); com vida-de-prateleira variando de 2 meses a 4°C (Kloepper e Schroth, 1981) até 12 meses a 5°C (Wiyono et al., 2008). As formulações à base de talco e turfa utilizadas no presente trabalho

causaram a redução da população de *P. chlororaphis* 63-28 em três unidades log ufc mL⁻¹ de substrato após a sua adição (dados não mostrados). A baixa sobrevivência da bactéria nesses materiais pode ser explicada pela baixa umidade, sendo de 8% para o talco e de 40% para a turfa, aliado aos valores extremos de pH (9 para o talco e 3 para a turfa). Amer e Utkhede (2000) verificaram baixa sobrevivência de *P. putida* S9 em talco após 45 dias de armazenamento nas temperaturas de 0°C e 22°C. Paulitz e Bélanger (2001) também verificaram baixa sobrevivência de *P. chlororaphis* 63-28 em turfa com a umidade de 45% e 25%.

A formulação com fibra de coco com a umidade entre 45-80% e pH 7 proporcionou a maior vida-de-prateleira das bactérias. A população de *P. chlororaphis* 63-28 manteve-se na mesma unidade log ufc mL⁻¹ de substrato por um período de 32 semanas em fibra de coco a 80% de umidade e por 120 dias (período avaliado) em fibra de coco a 75% de umidade a 3±1°C (Figuras 1 e 2). *P. aureofaciens* TX-1 manteve-se na mesma unidade log ufc mL⁻¹ em fibra de coco com a umidade de 75% a 3±1°C por um período de 60 dias (Figura 2). A adição de carboximetilcelulose ou goma xantana não aumentou a vida-de-prateleira das bactérias em fibra de coco a 80% de umidade (Figura 1). Os resíduos agroindustriais obtidos por meio do processamento do coco verde ou maduro vêm sendo utilizados no beneficiamento de fibras, como combustíveis de caldeiras, na produção de tapetes e estofamentos e na formulação de substratos para uso agrícola. A utilização da fibra de coco em diversos segmentos industriais é uma alternativa para minimizar o impacto ambiental provocado por esse resíduo sólido (Cempre, 1998; Rosa et al. 2001; Moreira et al. 2008). Dentre as características do substrato agrícola à base de fibra de coco pode-se destacar a alta retenção de umidade, a resistência a degradação, a uniformidade, a possibilidade de esterilização e a baixa disponibilidade de nutrientes (Moreira et al. 2008; Rosa et al. 2001).

As formulações de *Pseudomonas* spp. armazenadas na temperatura de 3±1°C propiciaram melhor vida-de-prateleira das bactérias, quando comparadas com as formulações armazenadas a 22±1°C (Figuras 1, 2 e 3, Tabelas 1, 2 e 3). Baixas temperaturas diminuem a atividade metabólica, fator que pode ter proporcionado a maior longevidade bacteriana e conseqüentemente a maior vida-de-prateleira das formulações

armazenadas a $3\pm 1^\circ\text{C}$. Aliado ao fator temperatura, os substratos com os maiores valores de umidade proporcionaram a maior sobrevivência bacteriana (Figura 2 e Tabela 2). A maior sobrevivência de *P. chlororaphis* 63-28 em substratos com elevadas umidades também foi verificada por Paulitz e Bélanger (2001). Wiyono et al. (2008) formularam *P. fluorescens* P5 em diversos substratos para o tratamento de sementes de beterraba açucareira e verificaram que a sobrevivência da bactéria foi maior em formulações com a umidade de 60% do que em formulações com a umidade de 10% durante o período de 12 meses a 5°C . A maior sobrevivência de *Pseudomonas* spp. em fibra de coco com elevado teor de umidade pode ser explicada pela proteção ao dessecamento bacteriano fornecido pelos elevados valores de água presentes no substrato.

Pseudomonas chlororaphis 63-28 é um dos melhores isolados bacterianos utilizados para o controle de podridões radiculares e promoção de crescimento em cultivos em casa de vegetação no Canadá (Paulitz e Bélanger, 2001), sendo um eficiente agente de controle biológico e promotor de crescimento em hidroponia (Gagné et al. 1993; Liu et al. 2007; Liu et al. 2003; Owen-Going et al. 2003). Além da eficiente competição por espaço e nutrientes com patógenos radiculares, o isolado bacteriano produz antibióticos, induz resistência nas plantas e produz hormônios de crescimento vegetal (Paulitz e Bélanger, 2001; Zheng et al. 2000; EPA, 2009). Devido à efetividade de *P. chlororaphis* 63-28 como agente de biocontrole, em 1994 foi implantado o projeto SYNERGIE no Canadá, onde um dos intuitos era formular *P. chlororaphis* 63-28 em turfa para a utilização em cultivos protegidos, com a vida-de-prateleira de seis meses a um ano. Os pesquisadores verificaram a maior sobrevivência do isolado 63-28 em turfa com a umidade de 100-150% (v/v) e a menor sobrevivência em turfa com as umidades de 45% e 25%. No entanto, mesmo nas melhores umidades a população bacteriana declinou para níveis inferiores a 10^6 ufc g^{-1} após 1 a 2 meses (Paulitz e Bélanger, 2001).

A infestação da solução nutritiva com células de *P. chlororaphis* 63-28 preservadas por 140 dias em fibra de coco a $3\pm 1^\circ\text{C}$ promoveu o desenvolvimento de alface hidropônica de forma superior a infestação da solução nutritiva com células da bactéria cultivadas por 2 dias em meio de cultura TSB (Tabela 5). Maior pico de crescimento foliar foi verificado aos dois dias após a adição das células preservadas por 140 dias em fibra de coco e aos

quatro dias após a infestação com as células cultivadas por 2 dias (Figura 5). Possivelmente, o maior pico de crescimento foliar verificado no tratamento com as células preservadas por 140 dias é efeito da maior eficiência de colonização radicular dessas células quando comparadas com as células cultivadas por 2 dias. A maior eficiência de colonização das células preservadas em fibra de coco pode ser explicada pela adesão de pequenas partículas da fibra de coco que não foram retidas pela filtragem em gaze nas raízes de alface e pela resistência às condições adversas das células bacterianas após o período de armazenamento. A adesão da fibra de coco nas raízes pode ter facilitado a colonização bacteriana nas raízes das plantas e a expressão dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas da bactéria, como a produção de hormônios de crescimento vegetal (EPA, 2009). Devido à baixa disponibilidade de nutrientes na fibra de coco pode ter ocorrido uma mudança no estado fisiológico de *P. chlororaphis* 63-28 conferindo maior capacidade de sobrevivência e colonização radicular quando introduzida no ambiente hidropônico. Mudanças na fisiologia bacteriana são verificadas após períodos com reduções de nutrientes no meio onde as bactérias estão presentes (Watanabe et al. 2000). Dentre as mudanças que ocorrem nas células, Watanabe et al. (2000) citam a mudança na forma da célula, no conteúdo de RNA, no padrão de expressão de proteínas, na mobilidade, na quantidade de polímeros extracelulares e na resistência a condições adversas. Overbeek et al. (1995) verificaram aumento da resistência de *P. fluorescens* a tratamentos letais como a exposição a elevadas temperaturas e a pressão osmótica após o cultivo bacteriano em meio de cultura com baixo teor nutricional. Kloepper e Schroth (1981) verificaram maior eficiência na utilização de células bacterianas promotoras de crescimento formuladas quando comparadas com células não formuladas. Os autores atribuem a maior promoção de crescimento de sementes de batata das células formuladas em talco, acrescido com 20% de goma xantana, ao estado fisiológico inativo das células e a proteção contra estresses ambientais proporcionada pela formulação bacteriana.

No mercado internacional estão disponíveis os bioprodutos Cedomon[®] e Cerall[®] (Bioagri, Suécia) para o tratamento de sementes de aveia, cevada e trigo formulados com *P. chlororaphis*. A vida-de-prateleira dos bioprodutos é de 56 dias quando armazenados de 4 °C - 8 °C e de 21 dias em temperatura ambiente (Lantmannen, 2009). Os resultados

encontrados no presente trabalho demonstram que *P. chlororaphis* 63-28 possui vida-de-prateleira de 224 dias a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ quando formulada em fibra de coco.

As barreiras para o uso comercial de *Pseudomonas* spp. incluem a falta de informações sobre a tecnologia de formulação que otimizem o custo de produção massal e a aplicação dos agentes de biocontrole (Slininger et al. 1996; Wiyono et al. 2008). Os resultados encontrados no trabalho indicam a viabilidade de utilização da fibra de coco como substrato para a formulação de *Pseudomonas*, devido a sua elevada vida-de-prateleira e a preservação da capacidade biológica de *P. chlororaphis* 63-28 demonstrada na promoção de crescimento de alface hidropônica.

Referências

Amer, G.A., and Utkhede, R.S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46 : 809-816.

Bakker, P.A.H., Pieterse, C.M.J., and Van Loon, L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 97 : 239-243.

Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4 : 343-350.

Cempre. Perfil de recicladora de fibras de coco. São Paulo, 1998. (Reciclagem & Negócio: Fibra de Coco).35p.

Chatterton, S., Sutton, J.C., and Boland, G.J. 2004. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. *Biol. Control.* 30 : 360-373.

EPA: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>, acesso em 04 de janeiro de 2009.

Gagné, S., Dehbi, L., Le Quéré, D., Cayer, F., Morin, J-L., Lemay, R., and Fournier, N. 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting

rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat based growing media. *Soil Biol. Bioch.* 25 : 269-272.

Haas, D., and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 1-13.

Khan, A., Sutton, J.C., and Grodzinski, B. 2003. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. *Biocont. Sci. Tech.* 13 : 615-630.

Kloepper, J.W., and Schroth, M.N. 1981. Development of a power formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology.* 71 : 590-592.

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., and Schroth, M.N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Anim. Plant Scien.* 8 : 60-64.

Krishnamurthy, K., and Gnanamanickan, S.S. 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf714: Evaluation of a marker gene and formulation. *Biol. Cont.* 13 : 158-165.

Lantmannen Bioagri: http://www.bioagri.se/pseudomonas_eng.html. Acesso em: 25 de setembro de 2009.

Liu, W.; Sutton, J.C. Effectiveness of microbial agents to protect *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. *B&C Tests*, v. 18, p.1-2, 2003. Disponível em: <www.apsnet.org/online/BCtests/reports/2003/V023.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2007.

Liu, W., Sutton, J.C., Grodzinski, B., Kloepper, J.W., and Reddy, M.S. 2007. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. *Phytoparasitica* 35: 159-178.

Moreira, M. A., Dantas, F.M., Santos, C.P. D., Oliveira, L.M.D., and Moura, L.C. 2008. Produção de mudas de pimentão com o uso de pó de coco. *Rev. Fap.* 4 : 19-26.

Nakkeeran, S., Kavitha, K., Chandrasekar, G., Renukadevi, P., and Fernando, W.G.D. 2006. Induction of plant defense compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23

and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. Bioc. Sci. Tech. 16 : 403-416.

Overbeek, L.S. V., Eberl, L., Givskov, M., Molin, S., and Elsas, J.D.V. 1995. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing soil. Ap. Envir. Microbiol. 61 : 4202-4208.

Owen-Going, T.N., Sutton, J.C, and Grodzinski. 2003. Relationship of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Can. J. Plant Pathol. 25 :155-167, 2003.

Paulitz, T.C., and Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39 : 103-133.

Rosa, M. F., Santos, J. S. S., Montenegro, A. A. T., Abreu, F. A. P., Araújo, F. B. S., and Norões, E. R. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6p. (Comunicado Técnico, 5).

Shaner, G., and Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology. 67 : 1051-1056.

Slininger, P.J., Cauwenberge, J.E.V., Bothast, R.J., Weller, D.M., Thomashow, L.S., and Cook, R.J. 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. Appl. Microbiol. Biotechn. 45 : 391-398.

Stockwell, V. O., and Stack, J.P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. Phytopathology. 97 : 244-249.

Vidhyasekaran, P., and Muthamilan, M. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. Plant Dis. 79 : 782-785.

Vidhyasekaran, P., and Muthamilan, M. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Bioc. Sci. Tech. 9 : 67-74.

Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, and Vasumathi, K. 1997. Power formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. Biol. Cont. 8 : 166-171.

Watanabe, K., Miyashita, M., and Harayama, S. 2000. Starvation improves survival of bacteria introduced in activated sludge. App. Environ. Microbiol. 66 : 3905-3910.

Wiyono, S., Schulz, D.F., and Wolf, G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. Biol. Cont. 46 : 348-357.

Zheng, J., Sutton, J.C., and Yu, Hi. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. Can. J. Plant Pathol. 22 : 368-379.

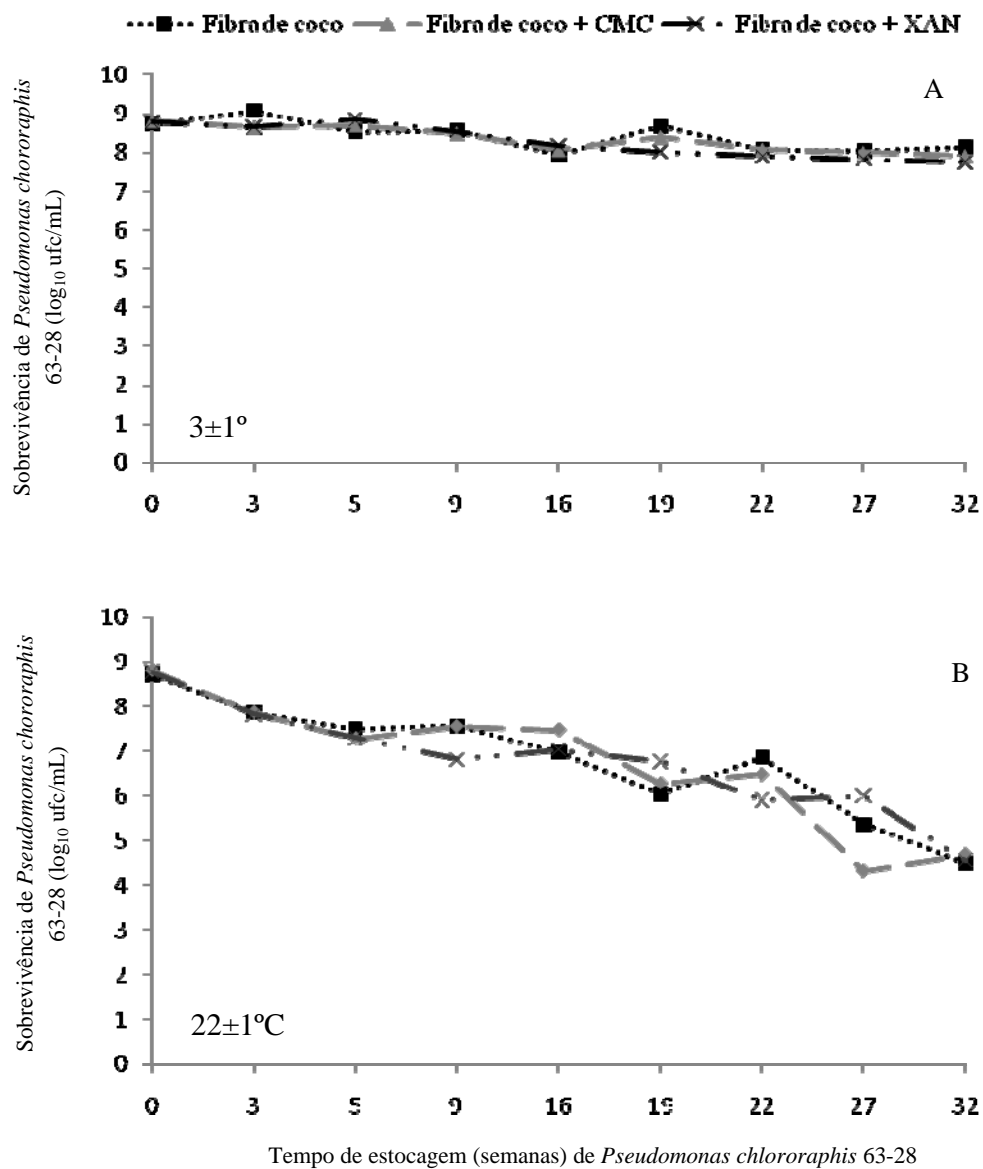


Figura 1. Sobrevivência (Vida-de-prateleira) de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em fibra de coco com ou sem a adição de carboximetilcelulose (CMC) ou goma xantana (XAN) nas temperaturas de 3±1°C (A) e 22±1°C (B).

Tabela 1. Sobrevivência de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em fibra de coco com ou sem a adição de carboximetilcelulose ou goma xantana, sob as temperaturas de $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$, sobre a área abaixo da curva de sobrevivência bacteriana (AACSB).

Tratamento	AACSB	AACSB
	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$22\pm 1^\circ\text{C}$
Fibra de coco	1869,51 ⁽¹⁾ A ⁽²⁾	1506,94 B
Fibra de coco + carboximetilcelulose	1856,40 A	1488,75 B
Fibra de coco + goma xantana	1843,14 A	1498,11 B

⁽¹⁾Dados no sentido das colunas não foram significativos pelo teste F. ⁽²⁾Dados no sentido das linhas seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente, pelo teste LSD, a 5%.

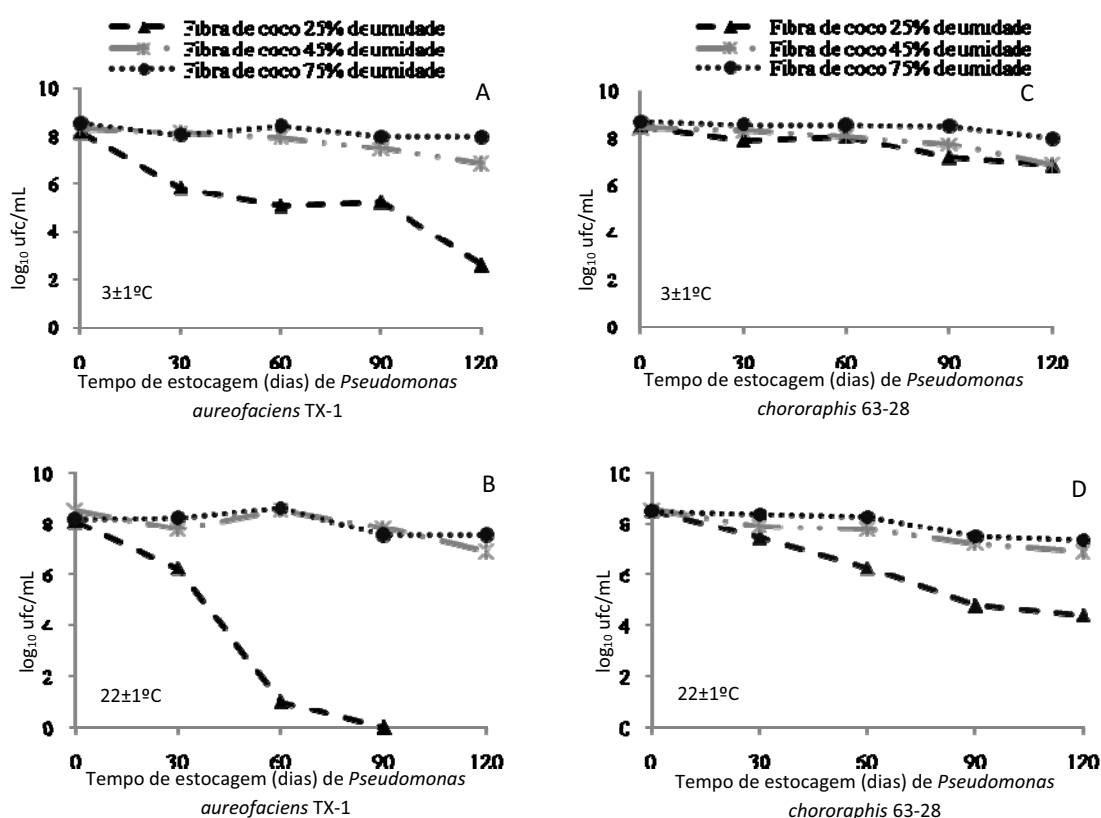


Figura 2. Sobrevivência (Vida-de-prateleira) de *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 (A-B) e *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (C-D) e em fibra de coco com diferentes umidades nas temperaturas de $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 2. Sobrevivência de *Pseudomonas* spp. em fibra de coco, com as umidades de 25%, 45% e 75%, sob as temperaturas de $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, sobre a área abaixo da curva de sobrevivência bacteriana (AACSB).

Tratamento	AACSB	AACSB
	$3\pm 1^{\circ}\text{C}$	$22\pm 1^{\circ}\text{C}$
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28		
Fibra de coco com 25% de umidade	913,79 c A ⁽¹⁾	764,34 b B
Fibra de coco com 45% de umidade	953,45 b A	919,39 a A
Fibra de coco com 75% de umidade	1018,26 a A	961,63 a B
<i>Pseudomonas aureofasciens</i> TX-1		
Fibra de coco com 25% de umidade	644,84 b A	339,52 b B
Fibra de coco com 45% de umidade	932,73 a A	957,08 a B
Fibra de coco com 75% de umidade	979,29 a A	968,47 a A

⁽¹⁾Dados seguidos pela mesma letra, minúscula no sentido da coluna e maiúscula no sentido da linha, não diferem entre si, pelo teste LSD, a 5%.

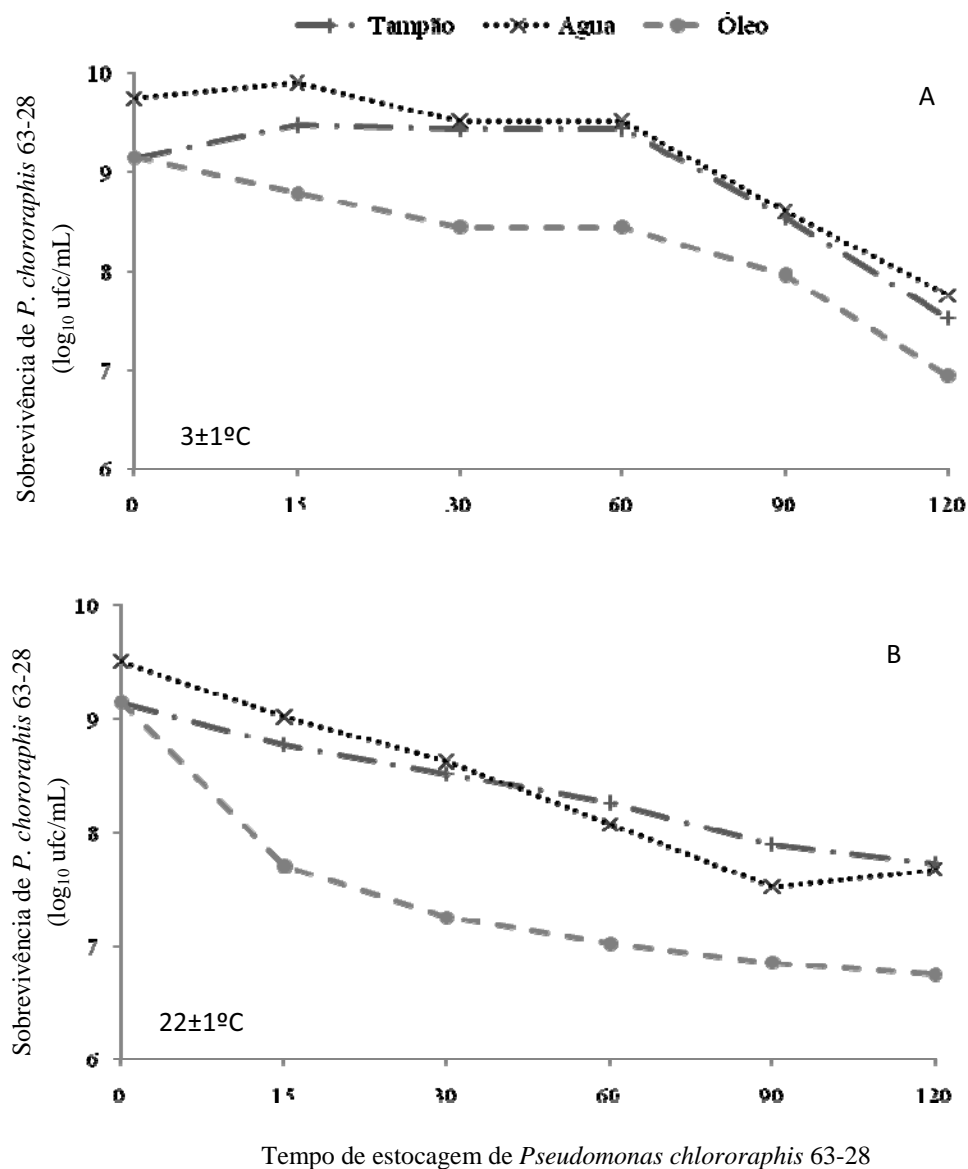


Figura 3. Sobrevivência de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em água, óleo de canola e tampão MgSO_4 0,1M nas temperaturas de $3 \pm 1^\circ\text{C}$ (A) e $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (B).

Tabela 3. Sobrevivência de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 em água, óleo de canola e tampão sulfato de magnésio, sob as temperaturas de $3\pm 1^\circ\text{C}$ e $22\pm 1^\circ\text{C}$, sobre a área abaixo da curva de sobrevivência bacteriana (AACSB).

Tratamento	AACSB	AACSB
	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$22\pm 1^\circ\text{C}$
Água	1095,76 a A ⁽¹⁾	982,75 a B
Óleo de canola	987,04 b A	864,61 b B
Tampão sulfato de magnésio	1075,70 a A	992,56 a B

⁽¹⁾ Dados seguidos pela mesma letra minúscula no sentido da coluna, e maiúscula no sentido da linha, não diferem entre si, pelo teste LSD, a 5%.

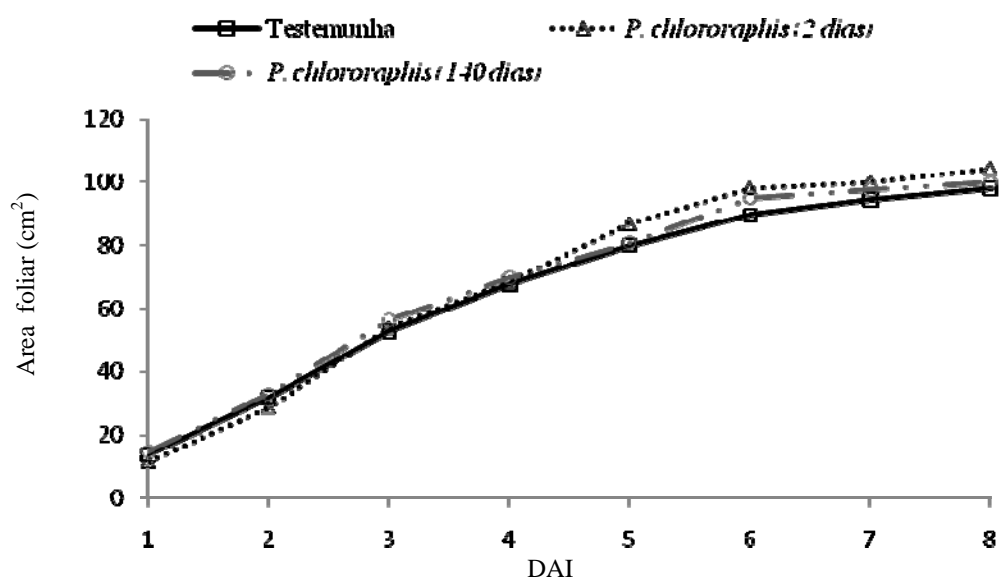


Figura 4. Crescimento foliar de uma folha jovem de planta de alface hidropônica após infestação da solução nutritiva ou não com células de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 multiplicadas por dois dias ou *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 formulada em fibra de coco e armazenada por 140 dias.

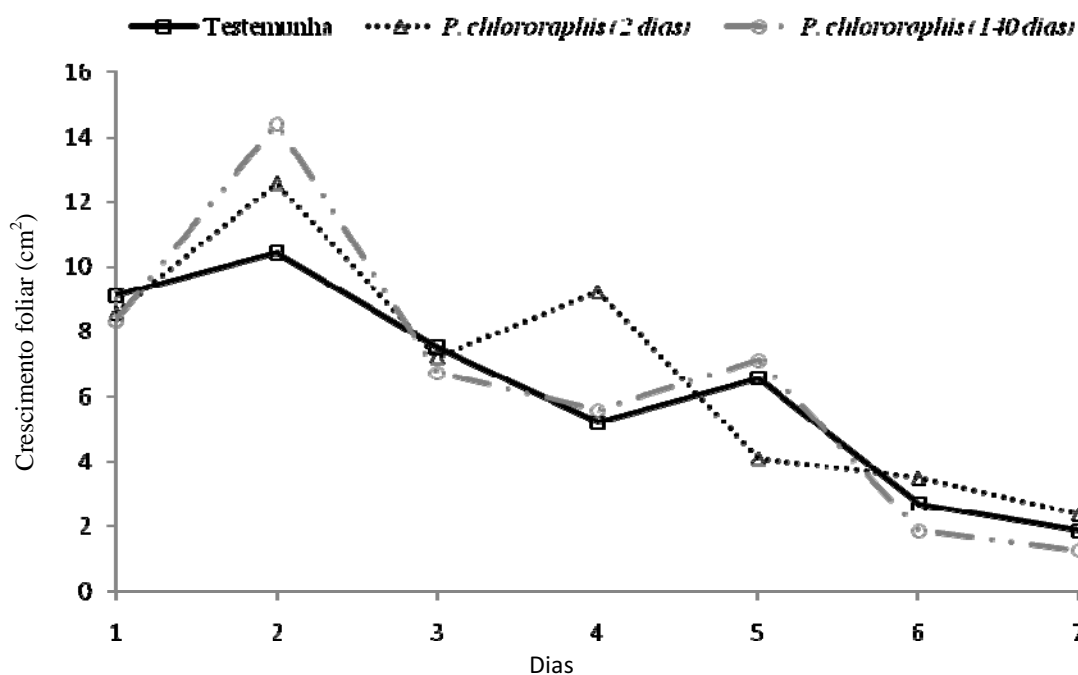


Figura 5. Taxa de crescimento foliar de plantas de alface hidropônica após infestação da solução nutritiva ou não com células de com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (2 dias) ou *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 (140 dias).

Tabela 4. Efeito da infestação da solução nutritiva ou não de alface hidropônica com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 multiplicada por dois dias ou *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 formulada em fibra de coco e armazenada por 140 dias, aos oito dias após a infestação das plantas sobre a área de crescimento foliar e a área da taxa de crescimento foliar.

Tratamentos	Área de crescimento foliar	Área da taxa de crescimento
Testemunha	938,27 ⁽¹⁾	64,76
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (2 dias)	976,73	71,82
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (140 dias)	967,95	72,21

⁽¹⁾Dados sem letra não foram significativos pelo teste F.

Tabela 5. Efeito da infestação ou não da solução nutritiva de plantas de alface hidropônica com *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 cultivada por dois dias ou formulada em fibra de coco e preservada a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 140 dias sobre a massa de alface hidropônica.

Tratamento	Massa fresca do sistema aéreo (g)	Massa fresca do sistema radicular (g)	Massa fresca total (g)	Massa seca do sistema aéreo (g)	Massa seca do sistema radicular (g)	Massa seca total (g)
Testemunha	88,65 b ⁽¹⁾	8,33 ⁽²⁾	96,98 b	5,02 b	0,36	5,38 b
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (2 dias)	92,76 b	8,47	101,23 b	5,27 ab	0,38	5,65 ab
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (140 dias)	103,13 a	8,69	111,82 a	5,79 a	0,39	6,18 a

⁽¹⁾Dados seguidos pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste LSD, a 5%. ⁽²⁾Dados sem letra não foram significativos no teste F.

5 CONCLUSÕES

Microrganismos residentes de manguezais são promissores agentes de controle biológico da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e promotores de crescimento de plantas, em cultivos hidropônicos;

A utilização dos agentes de biocontrole *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 é uma medida promissora para a supressão dos danos causados pela podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* em pimentão hidropônico.

A fibra de coco, com teores elevados de umidade, pode ser utilizada como substrato para a formulação de *Pseudomonas*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOLO, J.L.; LUZ, G.L.; GIRALDI, C.; GODOI, R.S.; BARROS, G.T. Cultivo hidropônico da alface empregando substratos: uma alternativa a NFT?. **Horticultura Brasileira**.v.22, n.4, p.794-798, 2004.
- BAKKER, P.A.H., PIETERSE, C.M.J., AND VAN LOON, L.C. Induced systemic resistance by fluoescnt *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, p. 239-243, 2007.
- BERGAMIM FILHO, A.; HIROSHI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia, v.1,p. 34-43, 1995.
- BLOEMBERG, G.V., AND LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion of Plant Biology**, v.4, p. 343-350, 2001.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z. V.; PAULA-JÚNIOR, T.J.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J.L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas – parte I. In. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Ed. Luz, W.C. p. 111-148, 2009.
- BOROWITZKA, M.A. Micro-algae as sources of pharmaceutical and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v.7, p. 3-15, 1995.
- CHATTERTON, S.; SUTTON, J. C.; BOLAND, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. **Biological control**, v. 30, p. 360-373, 2004.
- CHÉRIF, M.; TIRILLY, Y.; BÉLANGER, R. Effect of oxygen concentration on plant growth, lipidperoxidation, and receptivity of tomato roots to *Pythium* F under hydroponic conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.255-264, 1997.
- CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W. Potencial de *Trichoderma* sp. em promover o crescimento de alface cultivada em sistema hidropônico. **Summa Phytopathologica**, v.32, p.S-54, 2006.

CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W. **Controle da Podridão de Raiz e Promoção de Crescimento em Hidroponia com Bactérias**. In: Bettiol, W; Morandi, M. A. B (Eds). *Biocontrole de Doenças de Plantas: Usos e Perspectivas*. p.225-238, 2009.

DE JONGHE, K.; DE DOBBELAERE, I.; SARRAZYN, R., HÖFTE, M. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. **Plant Pathology**, v. 54, p. 219-226, 2005.

DICK, M. W. The Peronosporomycetes, pp. 39-72. In: McLaughlin, D. J. McLaughlin, E. G. & Lemke, P. A. (eds.). *The Mycota VII, part A. Systematics and evolution*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. p. 39-72, 2001.

ENDO, R.M.; COLT, W.M. Anatomy, cytology and physiology of infection by *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v.1, p. 215-223, 1974.

EPA: *Pseudomonas chlororaphis* 63-28:

http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006478.htm, acesso em 24 de setembro de 2009.

FAQUIN, V.; FURLANI, P.R. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, v.20, n. 200/201, p. 99-104, 1999.

FAVRIN, R.J.; RAHE, J.E.; MAUZA, B. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumber in British Columbia greenhouses. **Plant Disease**, v. 72, p. 683-687, 1988.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.195-200, 2002.

FURLANI, P.R.; BOLONHEZI, D.; SILVEIRA, L.C.P.; FAQUIN, V. Nutrição mineral de hortaliças, preparo e manejo de soluções nutritivas. **Informe Agropecuário**, v.20, n. 200/201, p. 90-98, 1999.

FURLANI, P.R. *Pythium* em sistemas hidropônicos – danos e perspectivas para o controle: Principais sistemas hidropônicos em operação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p.S-146-147, 2008.

GARCÍA, L. J. A.; PROBANZA, A.; RAMOS, B.; PALOMINO, M.R.; MAÑERO, F.J.G. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. **Agronomie**, v.24, p. 169-176, 2004.

GOLDBERG, N.P.; STANGHELLINI, M.E. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). **Phytopathology**, v. 90, n.11, p.1244-1246, 1990.

GOLDBERG, N.P.; STANGHELLINI, M.E.; RASMUSSEN, S.L. Filtration as a method of controlling *Pythium* root rot of hydroponically grown cucumbers. **Plant Disease**, v. 76, p. 777-779, 1992.

GRAVEL, V.; MARTINEZ, C.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. **BioControl**, v.50, p. 771–786, 2005.

GROWTH PRODUCTS. Disponível em: <http://www.growthproducts.com/pages/horticulture.asp?tables=featured&product=10>, acesso em 25 de março de 2009. NEW BIOPRODUCTS - http://newbioproducts.net/index_files/Page797.htm, acesso em 02 de abril de 2009.

HERRERO, M.L.; HERMANSEN, A.; ELEN, O.N. Occurrence of *Pythium* spp. *Phytophthora* spp. in Norwegian greenhouses and their pathogenicity on cucumber seedlings. **Journal of Phytopathology**, v.151, p. 36-41, 2003.

JENKINS, S.F.; AVERRE, C.W. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. **Plant Disease**, v. 67, p. 968-970, 1983.

KHAN, A.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n.6, p.615-630, 2003.

KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; KUC, J. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science Technology**, v.2, p.349-351, 1992.

LANTMANNEN BIOAGRI: http://www.bioagri.se/pseudomonas_eng.html, acesso em 25 de setembro de 2009.

LIU, W.; SUTTON, J.C; GRODZINSKI, B.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. **Phytoparasitica**, v.35, p.159-178, 2007.

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, n2, p. 111-181, 1999.

MEDEIROS, C.A.B.; ZIEMER, A.H.; DANIELS, J.; PEREIRA, A.S. Produção de sementes pré-básicas de batata em sistemas hidropônicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.110-114, 2002.

MORAES, C.A.G.; FURLANI, P.R. Cultivo de hortaliças de frutos em hidroponia em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, v.20, n. 200-201, p. 105-113, 1999.

NAKKEERAN, S., KAVITHA, K., CHANDRASEKAR, G., RENUKADEVI, P., AND FERNANDO, W.G.D. Induction of plant defense compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. **Biocontrol Science Technology**, v.16, p. 403-416, 2006.

NAKKEERAN, S.; DILANTHA, W.G.F.; SIDDIQUI, Z.A. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Ed. Siddiqui, Z.A. p. 257-296, 2005.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, n.2, p.155-167, 2003.

PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, v.39, p. 103-133, 2001.

PAULITZ, T.C.; ZHOU, T.; RANKIN, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. **Biological Control**, v.2, p. 226-237, 1992.

RANKIN, L.; PAULITZ, T.C. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of Pythium root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic cultures. **Plant Disease**, v.78, p. 447-451, 1994.

SCHUERGER, A.C.; PATEGAS, K.G. Management of two *Pythium* spp. in hydroponic lettuce production. **Phytopathology**, v.74, p. 796, 1984.

STANGHELLINI, M.E.; RASMUSSEN, S.L. Hydroponics a solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, v. 78, n. 12, p. 1129-1138, 1994.

STANGHELLINI, M.E.; KRONLAND, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, v.70, p. 1053-1056, 1986.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactantes: their identify and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v.81, n.1, p. 4-10, 1997.

STANGHELLINI, M.E.; STOWELL, L.J.; BATES, M.L. Control of root rot of Spinash caused by *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system by ultraviolet irradiation. **Plant Disease**, v.68, n.12, p. 1075-1076, 1984.

STOCKWELL, V. O., AND STACK, J.P. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. **Phytopathology**, v. 97, p.244-249, 2007.

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, n.4, 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.

UTKHEDE, R.S.; KOCH, C.A. Evaluation of biological and chemical treatments for gummy stem blight on cucumber plants grown hydroponically in greenhouses. **Biocontrol**, v. 49, n.1, p.109-117, 2004.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, n.21. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands. 1981.

ZHENG, J.; SUTTON, J.C.; YU, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.22, p. 368-379, 2000.

ZHOU, T.; PAULITZ, T.C. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots. **Phytopathology**, v. 83, p. 872-876, 1993.