

HENRIQUE LOPES DE MENDONÇA

**SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO E INDUTORAS DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM
FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

HENRIQUE LOPES DE MENDONÇA

**SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO E INDUTORAS DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM
FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2006

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Conselheiro)

Prof. José Rogério de Oliveira
(Conselheiro)

Profa. Rosângela D’Arc de Lima Oliveira

Prof. Derly José Henriques da Silva

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, paz...

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade e pela liberação para a conclusão do curso.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelo exemplo de pesquisador, pela orientação, paciência, compreensão e incentivo.

Aos Professores José Rogério de Oliveira e Leandro Grassi de Freitas, pelos conselhos e ensinamentos.

Aos Professores Derly José Henriques da Silva e Rosângela D'Arc Lima de Oliveira, pela contribuição para com a tese.

À minha mãe Terezinha, pelo amor incondicional, pelo carinho e incentivo.

À minha namorada, noiva e esposa Luisa, que esteve comigo em todos os momentos, apoiando e, principalmente, entendendo minha ausência.

A toda minha família, principalmente meu Avô João, minha Avó Maria e minha tia Rita, que sempre me apoiaram.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico, em especial Dirceu, Dora, Flávio e José Roberto, pela presteza e auxílio nos experimentos.

Aos amigos, professores e funcionários da Clínica de Doenças de Plantas, pela amizade e pela ajuda nos ensaios de campo.

BIOGRAFIA

HENRIQUE LOPES DE MENDONÇA, filho de Benito Aldo Furtado de Mendonça (*IM*) e Terezinha de Faria Lopes Mendonça, nascido em 03 de março de 1980 na cidade de Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em 1999 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, graduando-se em Janeiro de 2004, em Agronomia.

Em março de 2004 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em Agosto de 2004 assumiu o cargo de Engenheiro Agrônomo, integrando o quadro de funcionários da Universidade Federal de Viçosa, após aprovação em concurso público.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
BIBLIOGRAFIA	3
CAPÍTULO 1: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE FEIJOEIRO HÁBEIS EM PROMOVER O CRESCIMENTO E O INCREMENTO NA PRODUTIVIDADE DA CULTURA.....	6
RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Isolamento das rizobactérias.	10
2.2. Cultivo e preservação dos microrganismos.	11
2.3. Microbiolização de sementes.....	11
2.4. Seleção massal e ensaios de promoção de crescimento em condições de casa- de-vegetação.	12
2.5. Bioensaio de colonização radicular.	13
2.6. Bioensaio de solubilização de fosfatos.	13
2.7. Detecção da atividade de fosfatases.	13
2.8. Ensaios de campo.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1. Promoção de crescimento e seleção em casa-de-vegetação.	16
3.2. Colonização Radicular.....	23
3.3. Solubilização de Fosfatos.	24
3.4. Atividade de Fosfatases	24
3.5. Ensaios de campo: produtividade.	26
4. CONCLUSÕES	31

5. BIBLIOGRAFIA	32
CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DO FEIJOEIRO.	38
RESUMO	38
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Origem, cultivo e preservação dos microrganismos.....	43
2.2. Microbiolização de sementes.....	44
2.3. Seleção massal e re-testagem dos antagonistas de <i>X. a. pv. phaseoli</i> em casa-de-vegetação	44
2.4. Antibiose: método da dupla camada (Vidaver <i>et al.</i> , 1972).....	45
2.5. Potencial antagonístico: produção de sideróforos e quitinase.	46
2.6. Experimentos de campo.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. Seleção de antagonistas para o biocontrole.....	48
3.2. Antibiose.....	50
3.3. Produção de sideróforos e quitinase.	51
3.4. Ensaios de campo.....	51
4. CONCLUSÕES	58
5. BIBLIOGRAFIA	59
CONCLUSÕES GERAIS.....	66

RESUMO

MENDONÇA, Henrique Lopes de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro 2006. **Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro**. Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: Leandro Grassi de Freitas e José Rogério de Oliveira.

Duzentas rizobactérias, isoladas de amostras de solos de rizosfera e de rizoplano, de plantas de feijoeiro sadias e, ou que apresentavam baixa intensidade de doenças, foram investigadas quanto à capacidade de promover o crescimento em plantas de feijoeiro, aumentar a sua produção e atuar no biocontrole contra diferentes patógenos da parte aérea da cultura. Nos ensaios de promoção de crescimento, sementes de feijoeiro 'Ouro Negro' foram microbiolizadas e plantadas, procedendo-se à seleção massal das rizobactérias, em condições de casa-de-vegetação. Paralelamente, os isolados foram avaliados quanto à habilidade em solubilizar fosfatos e, para os isolados selecionados, realizou-se à quantificação de enzimas fosfatases. O isolado UFV-RP 28 solubilizou o fosfato em meio de cultura, porém, o isolado UFV-RP 31 foi superior ao isolado UFV-RP 28, obtendo maiores médias na quantificação das fosfatases. Avaliou-se a capacidade das rizobactérias em colonizar o sistema radicular de plantas de feijoeiro "in vitro", semeando-se sementes microbiolizadas em meio ágar-água semi-sólido (0,8%), e procedendo-se inspeções visuais diárias. Oito rizobactérias colonizaram o sistema radicular, entretanto, as rizobactérias selecionadas não demonstraram tal habilidade. Baseados nos ensaios "in vitro" e "in vivo", dois isolados (UFV-RP 28 e UFV-RP 31) foram selecionados como promissores em promover o crescimento das plantas e, levados ao campo para os ensaios de produtividade. O potencial antagonístico das rizobactérias foi verificado por meio de testes de antibiose "in vitro", a fim de observar possíveis efeitos tóxicos diretos dos antagonistas sobre o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sobre outros

patógenos da parte aérea da cultura. Quatro isolados apresentaram antibiose direta sobre o patógeno desafiante e, os três isolados selecionados não inibiram o crescimento de quaisquer patógenos. Os isolados selecionados também foram avaliados quanto à produção de sideróforos e quitinase. Os resultados foram positivos e negativos, respectivamente, para todos os três isolados. Nos ensaios de biocontrole, primeiramente procedeu-se à seleção massal dos antagonistas, por meio de inoculações de plantas de feijoeiro com o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Três isolados (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63) que tiveram as menores médias de lesões por centímetro quadrado foram selecionados. Na re-testagem, apenas o isolado UFV-RP 53 foi superior à testemunha, com redução de 50% na severidade da doença, sendo selecionado para os ensaios de campo. No primeiro experimento de campo foram avaliadas as severidades da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e da ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), que ocorreram naturalmente e de maneira simultânea, observando-se, no tratamento com o isolado UFV-RP 53 redução de 30% da severidade de ambas as doenças. No segundo, ocorreu apenas a ferrugem e, novamente o isolado UFV-RP 53 foi superior à testemunha, reduzindo a severidade em 43%. Pela separação espacial entre os componentes microbianos da interação e pela ausência de efeitos deletérios diretos dos antagonistas sobre os patógenos, acredita-se que o controle da doença esteja ocorrendo através da indução de resistência sistêmica. O isolado UFV-RP 53 foi identificado por análise de ácidos graxos e sequenciamento rRNA 16S como *Pseudomonas putida*.

ABSTRACT

MENDONÇA, Henrique Lopes de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Selection of rhizobacteria as growth-promoters and inducers of systemic resistance in bean.** Advisor: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee members: Leandro Grassi de Freitas and José Rogério de Oliveira.

Two hundred rhizobacteria obtained from rhizosphere and rhizoplane of healthy looking bean plants were investigated for their ability to promote growth in bean plants, increase grain yield and induce systemic resistance against leaf pathogens. In growth-promoting assays, bean seeds ('Ouro Negro') were microbiolized with a propagule suspension and next sown under greenhouse conditions for quantification of growth parameters. In the laboratory conditions each isolate was also tested, for its ability to solublize phosphate and produce phosphatases. The isolate RP 28 solubilized phosphate in culture medium, but isolate RP 31 produced higher activity of phosphatases than RP28. When the root colonization bioassay was performed by seed microbiolization, eight out of 200 isolates colonized roots, which did not include the isolates selected previously. Based on *in vitro* and *in vivo* assays, isolates UFV-RP 28 and UFV-RP 31 were selected to test for plant growth promotion. Despite growth promotion detected in the greenhouse trials, no yield increased was observed in field experiments. The antagonistic potentiality of all rhizobacteria was investigated "in vitro" in order to verify whether they would show direct antagonism against canopy pathogens. Only four isolates showed direct antibiosis against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* but not against other pathogens tested. The selected isolates did not show any antagonistic activity against pathogens. All the three isolates produced siderophore but not chitinases. Induction of systemic resistance in plants microbiolized with isolate UFV-RP 48, UFV-RP 53 or UFV-RP 63 was determined in greenhouse

experiments with use of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* as the challenging pathogen. These isolates in the previous testes were efficient for reducing disease severity. In the repeated inoculation, isolate RP 53 proved to be most efficient by reducing disease severity by 50% and was selected for field trial. Two experiments were done under field conditions. In the first, the severity of naturally occurring angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) and rust (*Uromyces appendiculatus*), was 30% lower on plants originating from from seeds microbiolized with the rhizobacterium UFV-RP 53. In a second experiment, angular leaf spot did not appear, and the severity of rust was 43% lower on plants originating from UFV-RP 53 treated plants. Considering the spatial separation between the microbial components of the interaction, the multiplicity of protection as well as the lack of direct antagonism against investigated pathogens, the observed biocontrol may be a situation of induced resistance. Because of the good performance of isolate UFV-RP 53 as biocontrol agent, including to under field conditions, it was identified by both fatty-acid analysis and 16S rRNA sequencing as *Pseudomonas putida*.

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*, é uma planta da família das *Leguminosae*, de crescimento determinado ou indeterminado (Vieira, 1983). Constitui-se não somente como base energética da alimentação, mas também em muitos casos, na fonte mais comum e disponível de proteínas. É um dos alimentos básicos do brasileiro e de outros povos da América Latina (Moura, 1982).

O Brasil, considerando apenas o gênero *Phaseolus*, é o maior produtor mundial de feijão. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno (Emprapa-CNPAF, 2003). Muito ainda se perde devido ao uso inadequado de práticas de manejo e, principalmente, por causa das doenças que ocorrem ao longo de todo o ciclo da cultura. Estima-se que as perdas provocadas por doenças sejam da ordem de 10 a 25% (Hall, 1994), porém, estas muitas vezes podem chegar a valores próximos a 100% (Makini & Danial, 1995).

Visando reduzir as perdas causadas pelos patógenos, diferentes medidas de controle têm sido recomendadas: rotação de culturas, manejo da irrigação, alteração do espaçamento e o controle químico, que certamente é o método mais empregado para o controle das doenças na cultura (do Vale & Zambolim, 1997). Entretanto, a preocupação com os efeitos adversos dos agroquímicos na saúde humana e no ambiente vêm aumentando e, cada vez mais, surgem restrições legais ou comerciais ao seu uso (Utkhede, 1996). Desta maneira, tem-se buscado alternativas ao uso dos pesticidas, e, dentre elas, está o controle biológico.

A utilização de rizobactérias, como agentes de biocontrole e promotoras de crescimento de plantas, vem sendo estudada de maneira contínua em inúmeras instituições de pesquisa do Brasil e do mundo (Bettiol, 1999; Brown,

1974; Chen *et al.*, 1996; Luz, 2001; Nordlund, 1996; Romeiro *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998).

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam o bom desempenho de rizobactérias como promotoras de crescimento em várias culturas (Chen *et al.*, 1996; Enebak *et al.*, 1997; Mei, 1989). Por exemplo, Chanway (1997), relata a utilização de rizobactérias como promotoras de crescimento em coníferas, numa tentativa de acelerar o processo de adaptação das mudas transplantadas, já que estas plantas são utilizadas para reflorestamento. De acordo com o autor, as rizobactérias tanto protegiam as raízes como aceleravam o crescimento e a emissão destas.

É também relatado o uso de rizobactérias como agentes de biocontrole, induzindo resistência sistêmica contra fungos, bactérias e vírus em *Arabidopsis*, feijoeiro, pepino e tomate (Van Loon *et al.*, 1998). Liu *et al.*, 1995a, constataram que rizobactérias do gênero *Pseudomonas* induziram resistência sistêmica contra murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em plantas de pepino.

Objetivou-se, neste trabalho, formar uma coleção significativa de possíveis antagonistas (aproximadamente 200 rizobactérias) a partir do isolamento de solo de rizosfera e de rizoplano de plantas saudáveis de feijoeiro, e testá-los como agentes de biocontrole para doenças bacterianas e fúngicas da parte aérea do feijoeiro, e também avaliá-los quanto à promoção de crescimento das plantas, em condições de casa-de-vegetação e de campo.

BIBLIOGRAFIA

- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças. **Ação Ambiental**, N. 5, Ano II, 1999.
- BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 181-197, 1974.
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v. 43(1), p. 99 -112, 1997.
- CHEN, Y. MEI, R.; LU, S., LIU, L., & KLOEPPER, J.W. The use of Yield increasing bacteria (YIB) as plant growth promoting rhizobacteria in chinese agriculture. **Management of Soil Borne Diseases**, ed. by R.S. UTHKHEDE & V.K. GUPTA. KALYANI, New Delhi, p.164 -184, 1996.
- DO VALE, F. X. R & ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de Plantas : grandes culturas**, v. 1, 554p., Viçosa, MG, 1997.
- EMPRAPA-CNPAP.2003
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm#topo>. Acesso: 23/03/2004.
- ENEBAK, S.A., WEI, G. & KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v. 44(1), p. 139-144, 1997.
- HALL, R. **Compendium of Bean Diseases**, St. Paul, APS Press,73p., 1994.

- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85(6), p. 695-698, 1995.
- LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 16-20, 2001.
- MAKINI, F.W. & D. L. DANIAL. Bean production and constraints in Kenya with emphasis on diseases. Breeding for disease resistance with emphasis on durability. **Proceedings of a regional workshop for eastern, central and southern Africa-1994**, Kisii, Kenya, p. 104-109, 1995.
- MEI, R. Yield Increasing Bacteria, **Agricultural Press**, Beijing, 128p, 1989.
- MOURA, S.T. Aspectos econômicos da cultura do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 8(90), p. 3-6, 1982.
- NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v. 17(2), p.35-44, 1996.
- ROMEIRO, R.S., A.B. MOURA, K. MATSUOKA & M.C. FERNANDES. Actynomicetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbionization. **89^a Annual Meeting of The American Phytopathological Society**, August, p. 9-13, 1997.
- UTKHEDE, R.S. Potential and problems of developing bacterial biocontrol agents. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 455-462, 1996.

VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J.. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Viçosa-MG: Imprensa Universitária - UFV, 231p., 1983.

CAPÍTULO 1: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE FEIJOEIRO HÁBEIS EM PROMOVER O CRESCIMENTO E O INCREMENTO NA PRODUTIVIDADE DA CULTURA.

RESUMO

Coletaram-se amostras de solos de rizosfera e de rizoplano, onde havia cultivo do feijoeiro, de plantas saudáveis e, ou que apresentavam baixa intensidade de ataque de patógenos e, isolaram-se 200 rizobactérias. Visando encontrar alguma rizobactéria capaz de promover o crescimento em plantas de feijoeiro e aumentar a sua produção, sementes da cultivar 'Ouro Negro' foram microbiolizadas com cada um dos isolados obtidos e plantadas em copos plásticos contendo solo não esterilizado, em casa-de-vegetação, procedendo-se à seleção massal das rizobactérias. Avaliou-se também a capacidade das rizobactérias em colonizar o sistema radicular de plantas de feijoeiro "in vitro", utilizando-se de bioensaio. Oito rizobactérias colonizaram o sistema radicular e, nenhuma das duas rizobactérias pré-selecionadas (UFV-RP 28 e UFV-RP 31) apresentou tal habilidade no bioensaio realizado. Todos os isolados também foram avaliados quanto à habilidade em solubilizar fosfatos e produzir enzimas fosfatases, dos quais 55 isolados foram considerados solubilizadores. Selecionaram-se dois isolados (UFV-RP 28 e UFV-RP 31) como promissores em promover o crescimento das plantas, em termos das variáveis avaliadas: aumento da área foliar, peso da matéria fresca, peso da matéria seca e peso do sistema radicular. O isolado UFV-RP 28 obteve resultado positivo no ensaio de solubilização de fosfato, entretanto, o isolado UFV-RP 31 logrou resultado superior na detecção da atividade de fosfatases. Os resultados de campo refletiram, em parte, os resultados obtidos em casa-de-vegetação. Apesar de se observar indícios de promoção de crescimento pelas variáveis de crescimento avaliadas, não se obteve incremento na produtividade da cultura em condições de campo.

ABSTRACT

Soil samples were collected from the rhizosphere and rhizoplane of bean plants either healthy or with minimal disease symptoms and isolation for the of 200 potential antagonists. All the isolates were screened for their ability to promote growth or yield increase of bean plants. Bean seeds ('Ouro Negro') were microbiolized with propagule suspension of each isolate and sown in plastic bags containing non-sterile soil in a greenhouse. The root colonization bioassay was also performed for all 200 isolates and only 8 of them showed positive results. The plant growth promoting potencial of all isolates was evaluated as well as their ability to produce phosphatases. Only two isolates, UFV-RP 28 and UFV-RP 31, promoted increases in leaf area, shoot fresh weight and root dry weight while 55 isolates solubilized phosphates. The isolate UFV-RP 28 did solubilized phosphate while isolate UFV-RP 31 showed phosphatase activity. In the field experiment these two bacteria did not show promote growth or increasing grain yield.

1. INTRODUÇÃO

O feijão é um dos alimentos básicos do brasileiro e de outros povos da América Latina, constituindo-se como base energética e fonte de proteínas na nossa alimentação (Moura, 1982). Segundo Harlan (1975), é a leguminosa de maior importância para o consumo humano direto.

Os principais países produtores de feijão são Brasil, China e Índia, que respondem por 50% da produção mundial (FAOSTAT, 2005).

No Brasil, os maiores estados produtores de feijão são Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás (MAPA, 2005). Porém, a produção brasileira não tem sido suficiente para atender a demanda interna. O consumo per capita no Brasil, que em 2001, ficou em torno 14,9 kg/hab/ano, vem caindo ao longo dos anos. Na década de 70 atingiu índices de até 23-24 kg/hab/ano (Emprapa-CNPAF, 2004).

Haja vista a importância econômica e alimentar do feijoeiro fazem-se necessárias buscas por medidas alternativas que possam reduzir as perdas e maximizar a sua produtividade.

Pesquisas utilizando-se rizobactérias como inoculantes em diferentes culturas, objetivando o incremento “natural” na produção, datam desde 1885, quando se começaram investigar microrganismos não rizobiais (Luz, 1996).

A partir de 1978, trabalhos de Burr *et al.* (1978) em batata e de Kloepper & Schroth (1978) em rabanete, foi reconhecido que as rizobactérias poderiam estimular o crescimento das plantas, despertou-se o interesse por estes organismos. Estabeleceu-se o conceito de rizobactérias PGPR, do termo em inglês Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Kloepper & Schroth, 1978). Mais tarde, pesquisadores chineses utilizaram a terminologia YIB - “Yield Increasing Bacteria”, bactérias que aumentam a produção, para designar o mesmo grupo de rizobactérias (Chen *et al.*, 1996).

Desde então, rizobactérias têm sido estudadas nas últimas décadas como inoculantes para o incremento da produção agrícola, para o controle biológico de patógenos de solo e ainda como indutores de resistência sistêmica (Chen *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995a,1995b; Van Loon *et al.*, 1998).

Encontrar uma rizobactéria que apresente boa capacidade de promover o crescimento de plantas, que possa ser utilizada para o incremento na produção agrícola, é tarefa árdua e o grande objetivo de pesquisadores que se empenham neste mister (Chen *et al.*, 1996; Van Loon *et al.*, 1998). Na China, Chen *et al.* (1996) relataram o emprego de rizobactérias em larga escala, sendo utilizadas por produtores a partir da metade dos anos 80, como ferramenta no manejo integrado. Luz (1997) para testar o efeito das rizobactérias em aumentar o rendimento de gramíneas, microbiolizou sementes de trigo e semeou-as em campo, constatando, ao final do ensaio, um acréscimo na produção de até 14% em relação à testemunha não microbiolizada. Gagné *et al.* (1993) relataram o aumento do rendimento de frutos de tomateiro comercializáveis, produzidos em condições de casa-de-vegetação, onde as mudas de tomateiro foram “inoculadas” com suspensão de rizobactérias do gênero *Pseudomonas*. Zhang *et al.* (1997), demonstraram que rizobactérias poderiam estimular o crescimento de plantas de soja, obtendo-se o aumento da taxa fotossintética, peso da matéria seca, do número de folhas e da área foliar.

Vários mecanismos estão envolvidos na promoção do crescimento das plantas por PGPR (Jeon *et al.*, 2003; Joo *et al.*, 2004) os quais podem ser divididos em mecanismos diretos e indiretos. De maneira direta, por exemplo, PGPRs podem produzir substâncias análogas a fitormônios, aumentar a permeabilidade das raízes, solubilizar e disponibilizar nutrientes como fósforo e nitrogênio, dentre outros (Chanway & Nelson, 1991; Glick & Bashan, 1997; Kloepper, 1993; Rodríguez & Fraga, 1999; Sumner, 1990).

No tocante ao fósforo, nutriente limitante nos solos agrícolas brasileiros, rizobactérias são ditas como capazes de solubilizar o fósforo adsorvido e

degradar a matéria orgânica presente no solo disponibilizando formas solúveis de fosfatos, através de enzimas fosfatases (Jeon *et al.*, 2003; Sahin *et al.*, 2004). Na fração orgânica do solo existem diferentes compostos, tais como ácidos nucléicos, fosfolipídeos, dentre outros que podem ser mineralizados, liberando o radical fosfato (Raghothama, 1999).

Diferentes autores demonstraram ganho significativo na produtividade do feijoeiro utilizando-se altas doses de fósforo (P), via adubação fosfatada no plantio (Fontes *et al.*, 1973, Chagas *et al.* 1983; Lana, 1988).

De maneira indireta, rizobactérias PGPRs atuam principalmente produzindo substâncias antimicrobianas, competindo por espaço, nutrientes e por nichos ecológicos com outros microrganismos do solo, ou até mesmo induzindo resistência (Elad & Chet, 1987; Kloepper, 1993; Kloepper *et al.*, 1980; Tomashow & Weller, 1988).

Assim, buscou-se neste trabalho testar 200 isolados de rizobactérias, obtidos de rizosfera e rizoplano de plantas sadias de feijoeiro, quanto a sua possível capacidade em solubilizar fosfatos, promover o crescimento de plantas de feijoeiro, e aumentar o rendimento da cultura em condições de campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento das rizobactérias.

Coletaram-se amostras de solo de rizosfera e de rizoplano, em lavouras de feijoeiro, em três diferentes localidades: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes (RJ), Campo Experimental da Agronomia e Campo Experimental Horta Nova - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG). Tais amostras foram procedentes de plantas de feijoeiro sadias e, ou que apresentavam baixa intensidade de ataque de patógenos.

Para o isolamento de rizobactérias da rizosfera foram adicionados 10g de solo em 100mL de solução salina (0,85% NaCl), procedendo-se à extração sob contínua agitação, em agitador rotatório de plataforma, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a diluição em série dos extratos de solo (fator 10) e, de cada diluição, retirou-se uma alíquota de 50 μ L, que foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), com o auxílio da alça de Drigalsky, incubando-se, em seguida, a 28°C. Colônias individualizadas de rizobactérias de rizosfera que surgiram, foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura. Procedimento semelhante foi adotado para o isolamento de rizobactérias do rizoplano, variando-se apenas a adição de 10g de raízes + solo aderido (raízes parcialmente lavadas). Isolaram-se 200 rizobactérias.

2.2. Cultivo e preservação dos microrganismos.

As rizobactérias isoladas foram cultivadas e preservadas por meio de repicagens periódicas (Romeiro, 2001) tubo a tubo em meio 523 para o uso contínuo nos ensaios realizados. Os isolados de rizobactérias selecionados como promissores em promover o crescimento de plantas de feijoeiro (item 3.1) foram paralelamente preservados por emulsificação em glicerina a 15% (Gerhardt, 1994), seguindo-se armazenamento a -80°C .

2.3. Microbiolização de sementes.

Sementes de feijoeiro 'Ouro Negro' foram microbiolizadas por embebição (Romeiro, 2000; Silva *et al.*, 2000). Para tanto, foi feita uma suspensão de propágulos de cada uma das duzentas rizobactérias isoladas (OD₅₄₀ = 0,5), pela adição de água esterilizada nos tubos de ensaio ou em placas de Petri contendo as culturas bacterianas previamente repicadas e com 24 horas de idade. As

sementes de feijoeiro, após desinfestação superficial (álcool 70%/30s e NaClO 4%/2min) foram imersas na suspensão bacteriana, mantidas sob agitação à temperatura ambiente, por 12 horas, sendo em seguida plantadas.

2.4. Seleção massal e ensaios de promoção de crescimento em condições de casa-de-vegetação.

Nestes ensaios as rizobactérias foram avaliadas quanto à habilidade putativa em promover o crescimento de plantas de feijoeiro, comparadas às plantas provenientes de sementes não expostas a rizobactérias.

Na seleção massal, as sementes de feijoeiro microbiolizadas com suspensão de propágulos dos antagonistas ajustada para $OD_{540} = 0,5$ foram colocadas para germinar em copos plásticos descartáveis de 0,3L, contendo composto de solo, areia e esterco (3:3:1) não esterilizado, em casa de vegetação. Como controle negativo utilizou-se sementes não microbiolizadas, imersas apenas em água. As variáveis avaliadas 30 dias após o plantio, para confirmação da promoção de crescimento, foram peso da matéria fresca e seca da parte aérea, peso do sistema radicular e a área foliar (cm^2), utilizando-se o medidor LI-COR (modelo 3100). Para cada rizobactéria em teste, foram feitas 5 repetições.

Após a seleção inicial, os melhores isolados foram novamente testados para a confirmação da hipótese, utilizando-se um número maior de repetições. Foram feitas 6 repetições, sendo que cada repetição constitui-se de 3 plantas. Avaliaram-se ao todo 18 plantas para cada antagonista. Desta vez, as variáveis avaliadas, 30 dias após o plantio, foram: altura, número de folhas e folíolos, peso da matéria fresca e seca e a área foliar.

2.5. Bioensaio de colonização radicular.

Sementes de feijoeiro microbiolizadas foram postas a enraizar em tubos de ensaio (duas por tubo) contendo meio ágar-água semi-sólido (0,8% de ágar) esterilizado. Os tubos foram mantidos em ambiente de laboratório e, após a germinação das sementes, realizaram-se inspeções visuais diárias para verificação da presença de crescimento bacteriano circundando as raízes, assumindo-se que o sistema radicular foi colonizado pelo isolado, conforme bioensaio desenvolvido por Romeiro *et al.* (1999).

2.6. Bioensaio de solubilização de fosfatos.

Em placas de Petri com meio de cultura contendo fosfato insolúvel CaHPO_4 (Cattellan & Hartel, 2000, adaptado de Sylvester-Bradley *et al.*, 1982), os isolados de rizobactérias foram repicados, em pontos equidistantes, e posteriormente incubados a 25°C. No decorrer do período de incubação (máximo até 7 dias), a formação de halo ao redor das colônias indicou a habilidade das rizobactérias em solubilizar o fosfato. Todos os duzentos isolados foram testados e, para cada rizobactéria, foram feitas três repetições.

2.7. Detecção da atividade de fosfatases.

Para a detecção e quantificação de enzimas fosfatases, utilizou-se como substrato o reagente o ρ -nitrofenilfosfato (P-NPP). Este, na presença de fosfatases, libera fosfato e ρ -nitrofenol, que por sua vez é um composto incolor que se torna amarelo em meio básico, conforme esquematizado na figura 1.

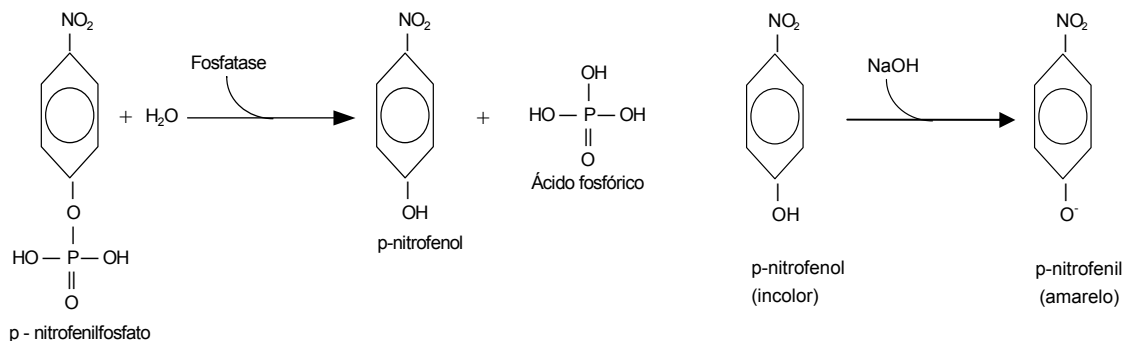


Figura 1 – Atividade de enzimas fosfatases sobre o ρ -nitrofenilfosfato (P-NPP).

Neste ensaio, utilizaram-se duas rizobactérias pré-selecionadas nos ensaios de promoção de crescimento (UFV-RP 28 e UFV-RP 31) e três rizobactérias (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63) pré-selecionadas nos ensaios de biocontrole (capítulo 2), as quais foram cultivadas em meio líquido e na fase exponencial de crescimento, tiveram sua concentração ajustada ($OD_{540} = 0,2$). As células bacterianas foram removidas por centrifugação (10.000g por 20 min). Logo após, 100 μ L do sobrenadante foi adicionado a 400 μ L de ρ -nitrofenilfosfato e mantidos em banho-maria (37°C/3h). Ao término do período de incubação, adicionaram-se 500 μ L de NaOH 1M. A atividade de fosfatase foi quantificada por espectrofotometria (410nm) e os valores obtidos comparados à curva padrão (Figura 2). Para cada rizobactéria em teste realizaram-se três repetições.

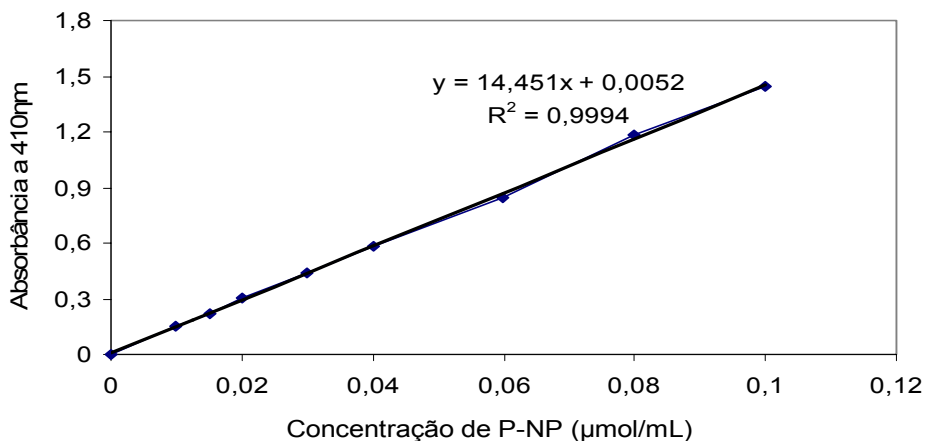


Figura 2 – Curva padrão para quantificação da atividade de fosfatase.

Para estimar a curva padrão adicionaram-se volumes conhecidos de ρ -nitrofenol a tubos de ensaio contendo água destilada (volume final 500 μ L) e NaOH (500 μ L). As concentrações usadas de ρ -nitrofenol, em μ mol/mL, foram: 0 (água); 0,010; 0,015; 0,020; 0,030; 0,040; 0,060; 0,080 e 0,100.

2.8. Ensaio de campo.

Depois de selecionadas as melhores rizobactérias, realizaram-se os testes em condições de campo, a fim de determinar o desempenho de cada antagonista nesta situação. Os ensaios de campo foram realizados da seguinte maneira: em linhas de 1 metro com espaçamento entre linhas de 50 cm, com 15 plantas por metro, foram realizados os seguintes tratamentos: sementes de feijoeiro microbiolizadas com os diferentes isolados selecionados e sementes embebidas apenas em água (controle negativo), plantadas de acordo com as especificações técnicas de plantio, quanto ao espaçamento, adubação e manejo.

Ao final do ciclo da cultura avaliaram-se, para cada tratamento, as variáveis de produção: número de vagens por planta, número de sementes por vagem, número de sementes por planta e peso (g) de sementes por planta, extrapolando-se, ao final, a produtividade para um hectare.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco blocos, com 10 repetições por bloco. Utilizaram-se também cinco plantas como bordadura para cada tratamento.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistca®, versão 6.0, procedendo-se o teste de média de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de 200 culturas bacterianas obtidas a partir do isolamento foi armazenado para estudos posteriores. Algumas culturas fluoresceram sob luz UV, mas a maioria não. Algumas apresentaram morfologia semelhante a espécies de *Bacillus* sp. Houve grande diversidade de cores e formas de colônia.

3.1. Promoção de crescimento e seleção em casa-de-vegetação.

Para cada variável de promoção de crescimento (peso da matéria fresca e seca da parte aérea, peso seco do sistema radicular e área foliar) avaliada na seleção massal, selecionaram-se 10 rizobactérias, cujas médias das variáveis avaliados em plantas oriundas de sementes microbiolizadas, foram superiores, numericamente, às médias das testemunhas, conforme se pode observar nas figuras 1, 2, 3 e 4. Entretanto, em alguns casos, plantas microbiolizadas por rizobactérias cujas médias foram superiores para determinada variável, mostraram-se inferiores em outras, como por exemplo, plantas microbiolizadas com o isolado UFV-RP 61, com média superior à testemunha apenas na variável área foliar (Figura 3).

Desta maneira, as médias de todos os tratamentos foram convertidas em índices e as testemunhas consideradas como índice 100% para cada parâmetro (Figura 5). Do universo de duzentas rizobactérias testadas, pré-selecionaram-se duas (UFV-RP 28 e UFV-RP 31) como mais promissoras em promover o crescimento de plantas de feijoeiro.

Na re-testagem, além das duas rizobactérias pré-selecionadas, testaram-se outras três (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63) que obtiveram o melhor desempenho nos ensaios preliminares de biocontrole (capítulo 2) e, que foi observado algum efeito na promoção de crescimento.

As médias das variáveis avaliadas para cada um dos tratamentos com os isolados, em termos numéricos, foram superiores à testemunha. Porém, somente as médias das variáveis peso da matéria fresca e seca da parte aérea, figuras 9 e 10, respectivamente, avaliados em plantas previamente microbiolizadas com a rizobactéria UFV-RP 31 foram superiores às observadas nas plantas testemunhas, diferindo-se estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Não houve, no entanto, diferença estatística entre as médias para as variáveis: altura (figura 6), número de folhas (figura 7), número de folíolos (figura 8) e área foliar (figura 11).

Em estudos semelhantes, Deuner et al. (2001) avaliaram variáveis diretas, tais como altura de planta, número de folhas ou folíolos, peso da matéria fresca ou seca, para testar 140 rizobactérias, aplicadas via tratamento de sementes, com finalidade de selecionarem isolados com características de PGPR em tomateiro, em casa de vegetação. Carrer Filho et al. (2001), também em tomateiro, avaliaram as mesmas variáveis, porém trabalhando com actinomicetos. Em ambos os casos, os autores também não lograram total êxito, visto que, algumas características avaliadas nos tratamentos onde se aplicaram rizobactérias também não diferiram estatisticamente das testemunhas.

Embora os resultados não forem totalmente preditivos quanto à promoção de crescimento do feijoeiro mediada por ambos os isolados pré-selecionados, mesmo assim estes foram levados a campo para a avaliação da produtividade de cada tratamento ao final do ciclo da cultura.

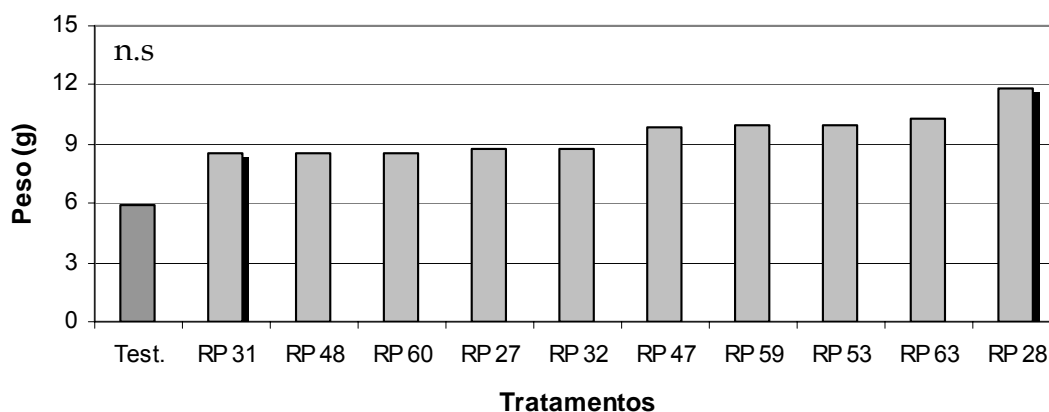


Figura 1 - Média de peso da matéria fresca da parte aérea de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com diferentes rizobactérias. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

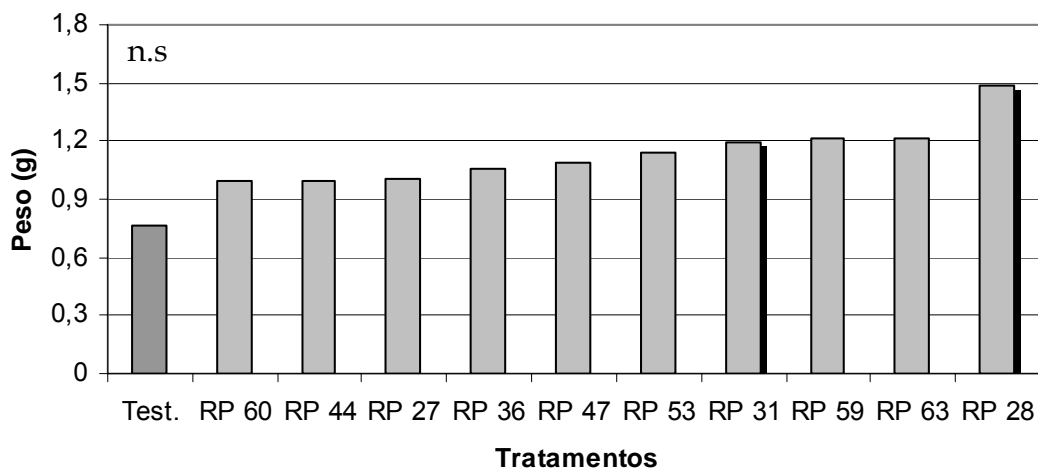


Figura 2 - Média de peso da matéria seca da parte aérea de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com diferentes rizobactérias. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

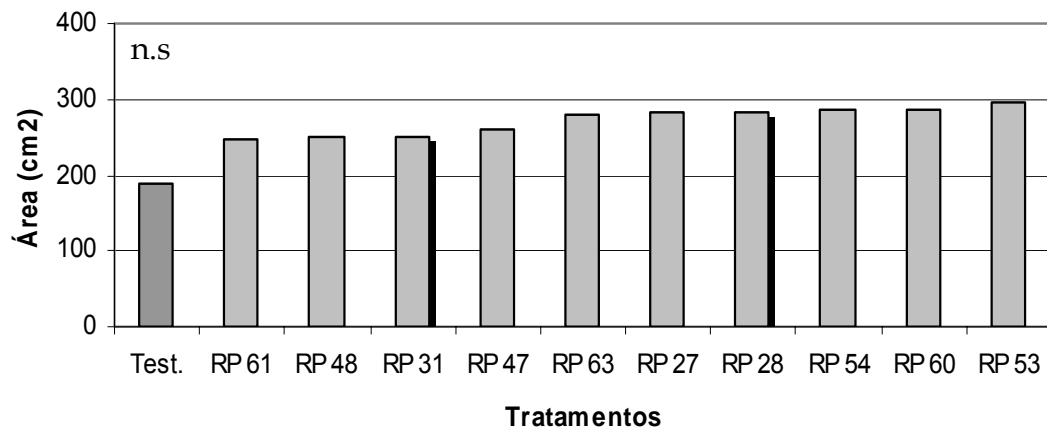


Figura 3 - Média da área foliar de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com diferentes rizobactérias. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

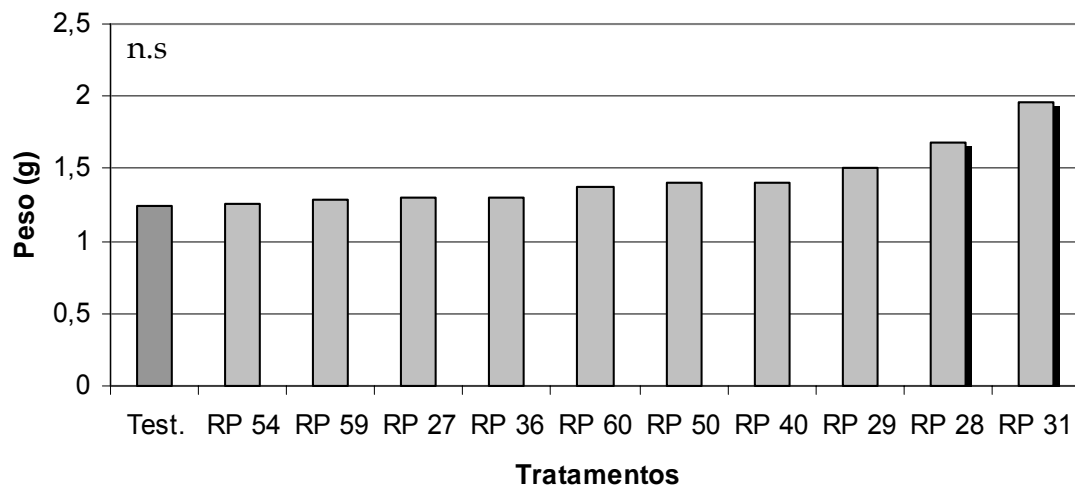


Figura 4 - Média de peso da matéria seca do sistema radicular de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com diferentes rizobactérias. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

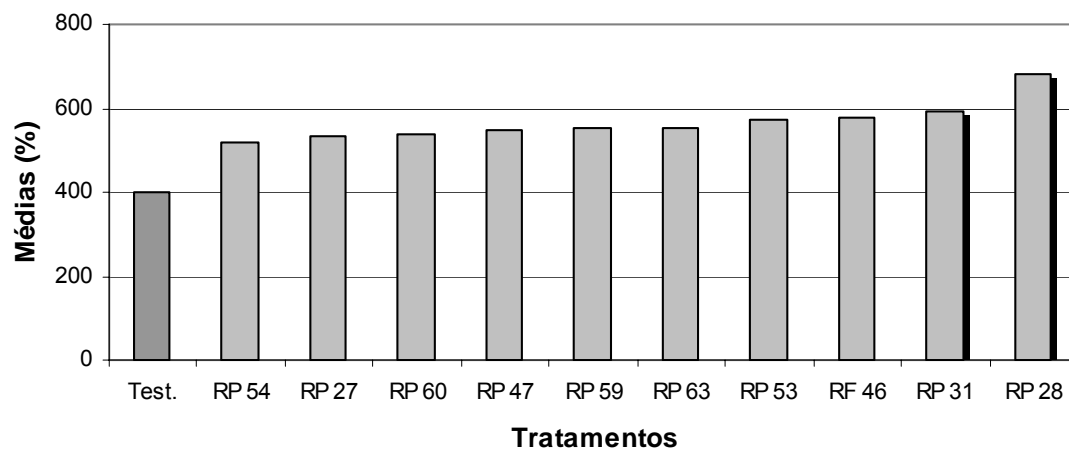


Figura 5 - Média, em porcentagem, do somatório das variáveis de crescimento avaliados nas plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com diferentes rizobactérias.

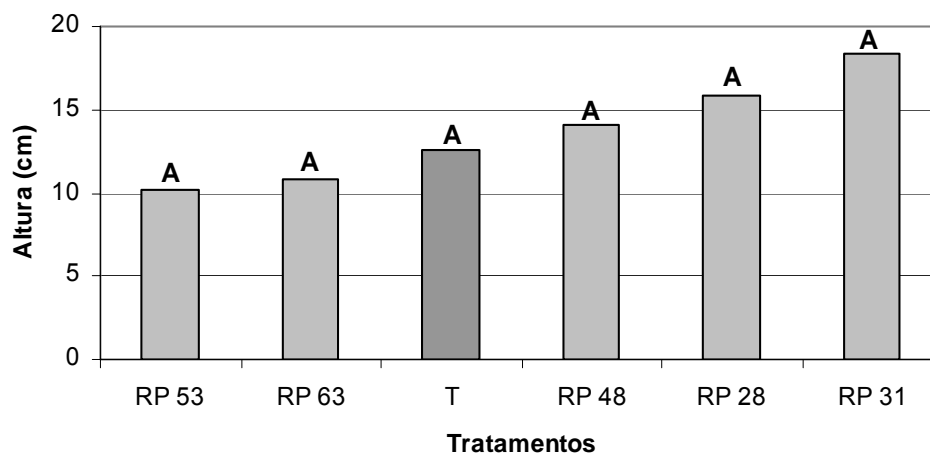


Figura 6 - Média da altura de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

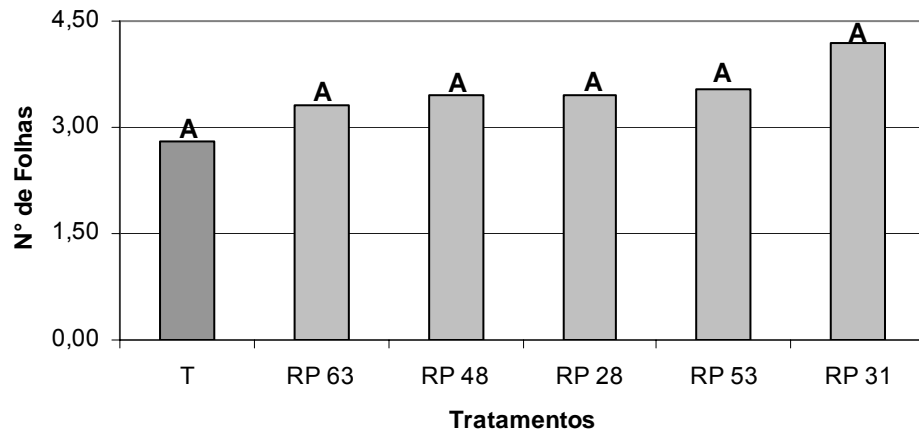


Figura 7 - Média do número de folhas de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

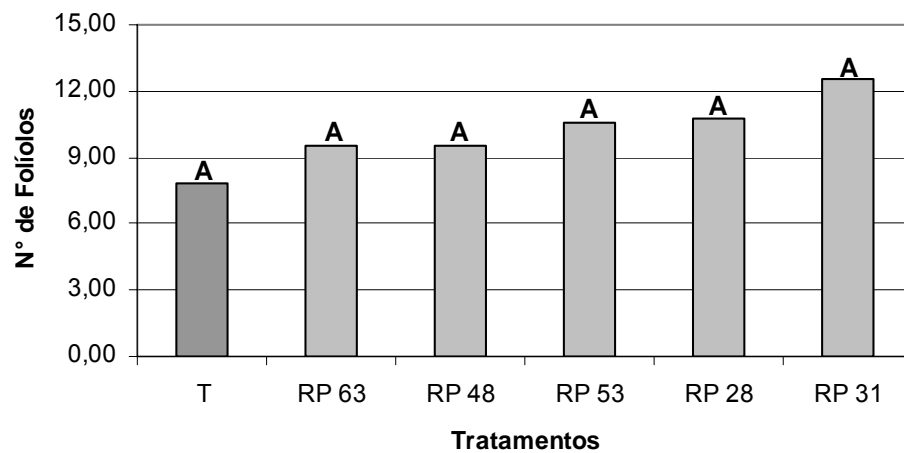


Figura 8 - Média do número de folíolos de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

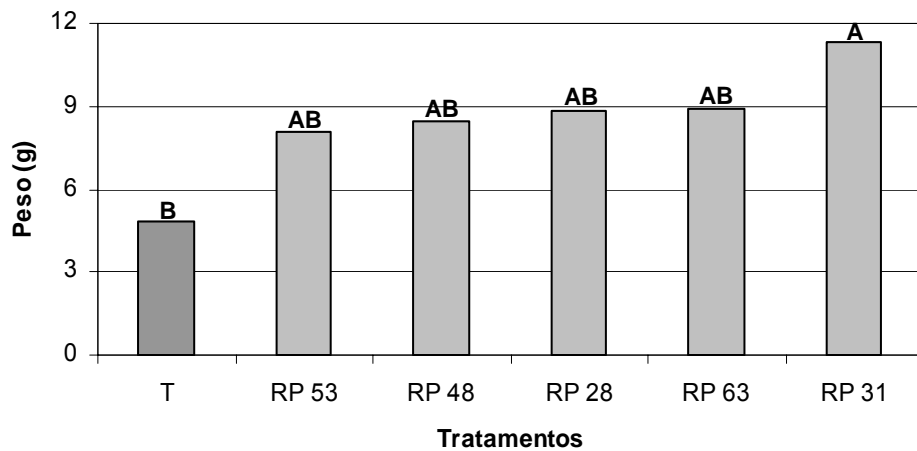


Figura 9 - Média do peso da matéria fresca da parte aérea de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

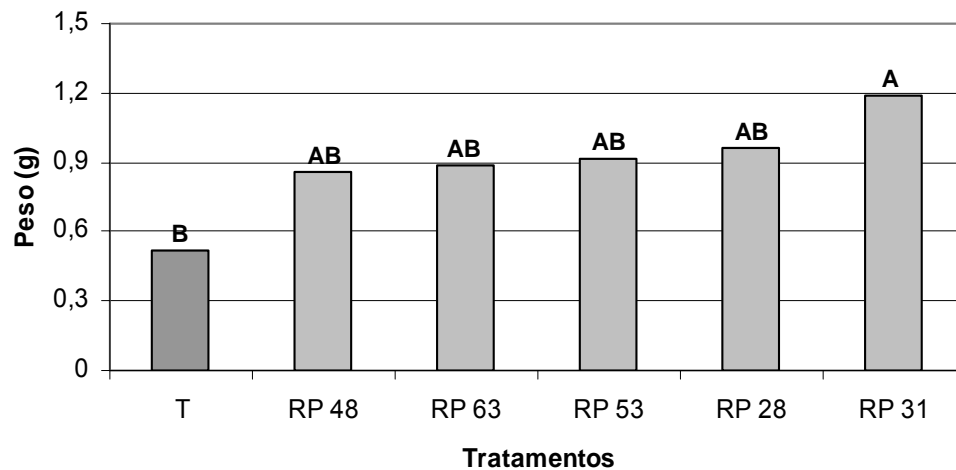


Figura 10 - Média do peso da matéria seca da parte aérea de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

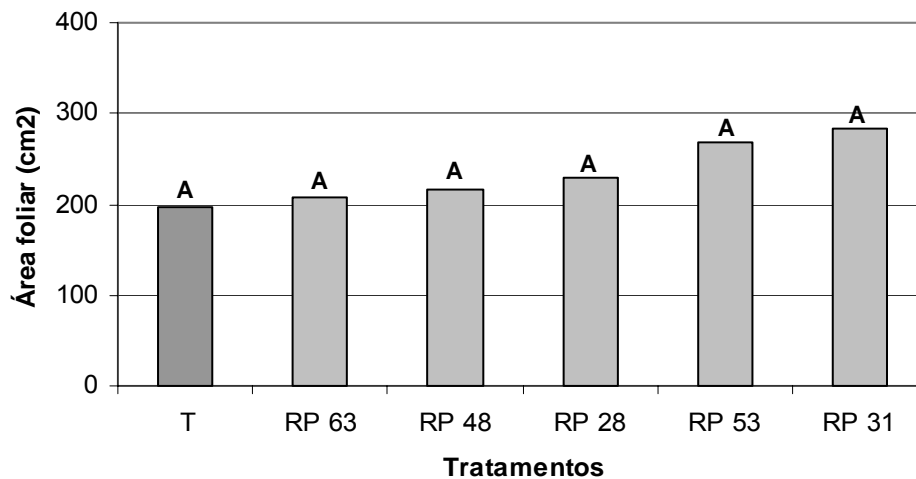


Figura 11 - Média da área foliar de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas com rizobactérias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2. Colonização Radicular.

Após observações diárias dos tubos verificou-se, dentre as duzentas rizobactérias testadas, que o crescimento bacteriano circundando as raízes aconteceu apenas em oito dos tratamentos. As rizobactérias com habilidade para colonizar o sistema radicular, conforme o bioensaio (Romeiro *et al.*, 1999) foram os isolados de rizoplano UFV-RP 03, UFV-RP 07, UFV-RP 08, UFV-RP 10, e UFV-RP 12, e, os isolados de rizosfera UFV-RF 14, UFV-RF 17 e UFV-RF 19.

Não se verificou relação entre isolados que colonizaram o sistema radicular e aqueles que foram pré-selecionados como possíveis promotores de crescimento.

3.3. Solubilização de Fosfatos.

Após 7 dias de incubação, observou-se a solubilização do fosfato pela formação de halos ao redor de algumas colônias das rizobactérias repicadas no meio. Dos 200 isolados testados em 55 foi observada atividade de solubilização de fosfato “in vitro” (Figura 12).

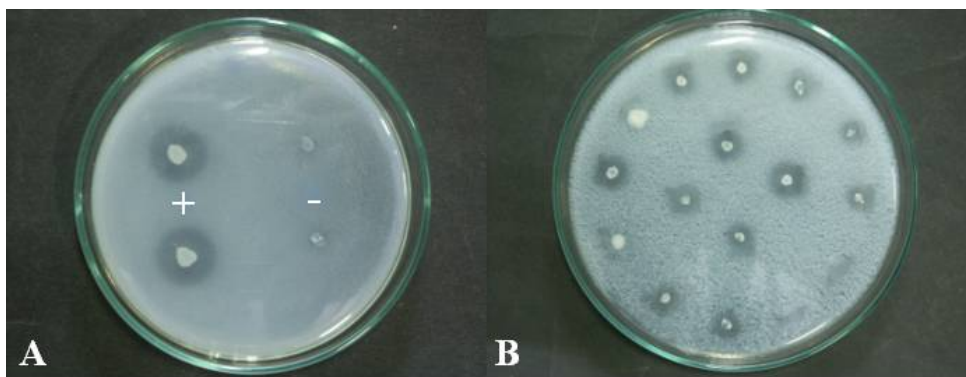


Figura 12 - Bioensaio de solubilização de fosfato. A - Controle positivo e negativo; B - Halos de solubilização de fosfato produzidos por algumas rizobactérias testadas.

Entre os dois isolados de rizobactérias selecionadas como promissoras em promover o crescimento do feijoeiro, apenas o isolado UFV-RP 28 foi capaz de solubilizar o fosfato no bioensaio realizado.

Contudo, deve-se ressaltar que bactérias produzem diferentes tipos de enzimas denominadas fosfatases, tanto ácidas como básicas (Rodríguez, 1999) e também, a simples acidificação do meio, promovida por diferentes ácidos orgânicos, produzidos e excretados pelas bactérias, a formação de CO₂, poderia solubilizar o fosfato e mascarar os resultados.

3.4. Atividade de Fosfatases

No ensaio de quantificação de enzimas fosfatases produzidas pelas rizobactérias, dentre os isolados pré-selecionados tanto para promoção de

crescimento quanto para o biocontrole, o que obteve o melhor desempenho foi o isolado UFV-RP 53. Apesar do isolado UFV-RP 28 ser o único, dentre os melhores isolados, capaz de solubilizar o fosfato, antes insolúvel, em meio de cultura (item 3.3), obteve o menor resultado na quantificação da produção de enzimas fosfatases.

As médias das concentrações de ρ -nitrofenol (usado para a quantificação das enzimas) obtidas para cada uma das rizobactérias avaliadas são expressas, a seguir, na figura 13.

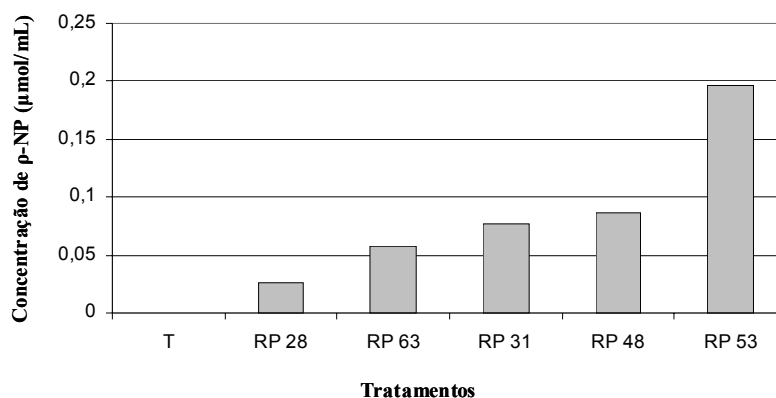


Figura 13 - Atividade de fosfatases, expressa pela concentração de ρ -nitrofenol ($\mu\text{mol/mL}$), exibida por rizobactérias.

A habilidade das PGPRs em disponibilizar nutrientes e aumentar sua absorção pelas plantas pode fazer a diferença em várias culturas, inclusive no feijoeiro, principalmente em sistemas agrícolas de baixa tecnologia. Nestes casos a aplicação das PGPR por pequenos agricultores supriria, em parte, as correções com fertilizantes sintéticos, de alto custo.

Em plantas de feijoeiro deficientes em fósforo observa-se desenvolvimento anormal, as folhas tomam coloração verde-escura e menos flores são produzidas. Conseqüentemente, há redução considerável na sua produção. Sabendo-se que nossos solos possuem grande quantidade de fósforo indisponível, e considerando a baixa mobilidade do elemento de uma maneira

geral, este poderá ser disponibilizado e aproveitado pelas plantas através de sua solubilização ou mineralização da matéria orgânica, que pode perfeitamente ser mediada pelo uso de rizobactérias que possuem a maquinaria genética necessária.

3.5. Ensaios de campo: produtividade.

Nos ensaios de campo não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis avaliadas: número de vagens por planta (Figura 14), número de sementes por vagem (Figura 15), número de sementes por planta (Figura 16) e peso de sementes por planta (Figura 17).

Extrapolando-se os valores obtidos para a produtividade média esperada para um hectare, observou-se ligeira diferença em termos numéricos entre os tratamentos, com vantagem para o tratamento com a rizobactéria UFV-RP 28, porém, não significativa (Figura 18).

Haja vista o potencial do uso de rizobactérias tanto em promover o crescimento quanto em aumentar o rendimento de culturas (Asghar *et. al.*, 2004) insucessos também não são incomuns, como por exemplo descrevem Antunez *et. al.* (2003).

Apesar de se observar promoção de crescimento através de algumas variáveis avaliadas em condições de casa-de-vegetação, estas não se revelaram em termos de aumento na produtividade da cultura, principal característica almejada em todo o processo de seleção.

A avaliação de variáveis diretas para a seleção massal de rizobactérias como promotoras de crescimento em feijoeiro talvez não tenha sido a melhor escolha. Porém, se considerar-se hipoteticamente uma situação onde a PGPR produza análogos de fitormônios, metabolize a matéria orgânica, disponibilize nutrientes, dentre outros, separados ou atuando conjuntamente, torna-se difícil separar o efeito quantitativo de cada um e o seu efeito na promoção de

crescimento. Neste caso, seriam utilizadas técnicas dispendiosas e de difícil execução. Entretanto, para diferentes culturas agrícolas ainda não foram estabelecidos parâmetros de avaliação para promoção do crescimento quando PGPR são aplicadas e, ao final, também poder-se-ia acabar por não encontrar verdadeiras PGPRs.

Apesar de não descartar-se a possibilidade de colonização radicular por parte destes isolados, obtidos nestas circunstâncias, a não relação entre a colonização do sistema radicular, através do bioensaio realizado, e os isolados que foram pré-selecionados como possíveis promotores de crescimento, soma-se ao insucesso da seleção.

Há que se considerar também que a resposta da atividade de uma rizobactéria pode variar em função da espécie de planta ou cultivar, das condições ambientes, do antagonismo encontrado no solo, da eficiência do isolado, dentre outros (Bashan, 1998). Deste modo, a veiculação das rizobactérias apenas em água, sem adição de quaisquer fatores de crescimento, nutrientes, adjuvantes, etc., também, pode ter contribuído para a não eficiência dos isolados nos ensaios realizados.

Por fim, deve-se considerar o fato de que poucas são as rizobactérias que detêm a habilidade de quando em associação ao sistema radicular de plantas, promoverem uma interação mútua, fornecendo a planta, por meio de metabólitos, hormônios, nutrientes, dentre outros, melhores condições vegetativas e reprodutivas.

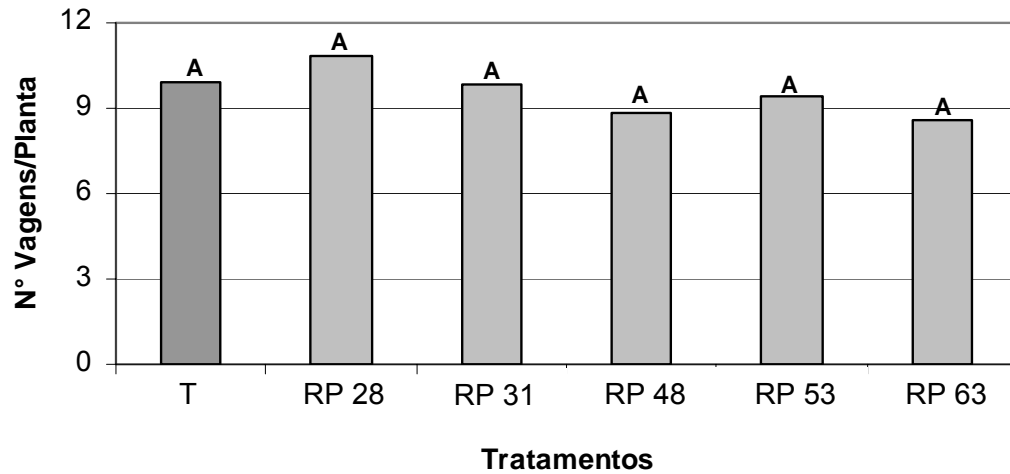


Figura 14 - Média do número de vagens por planta de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizada por rizobactérias e em condições de campo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

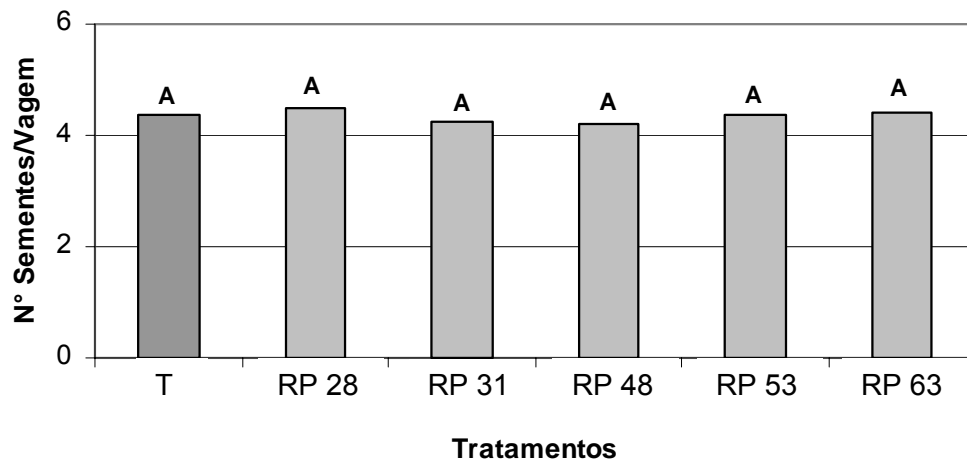


Figura 15 - Média do número de sementes por vagem de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas por rizobactérias e em condições de campo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

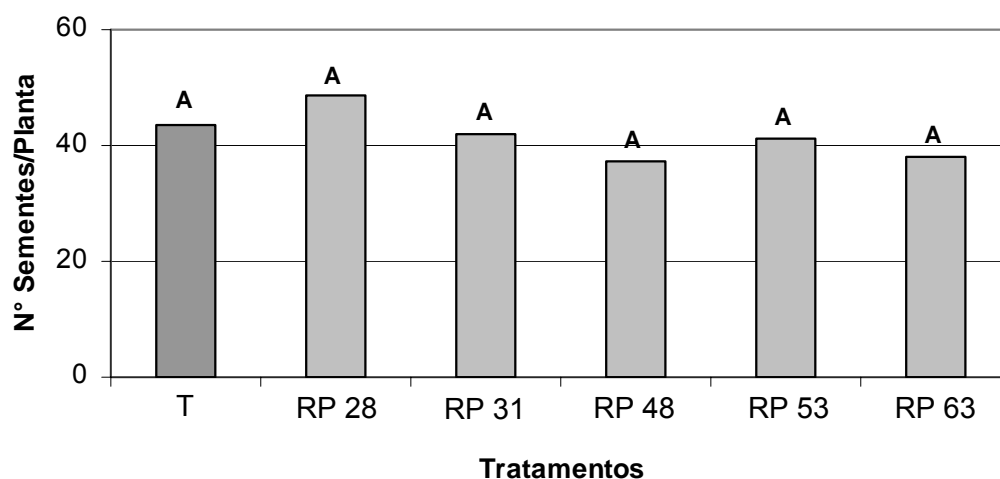


Figura 16 - Média do número de sementes por planta de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas por rizobactérias e em condições de campo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

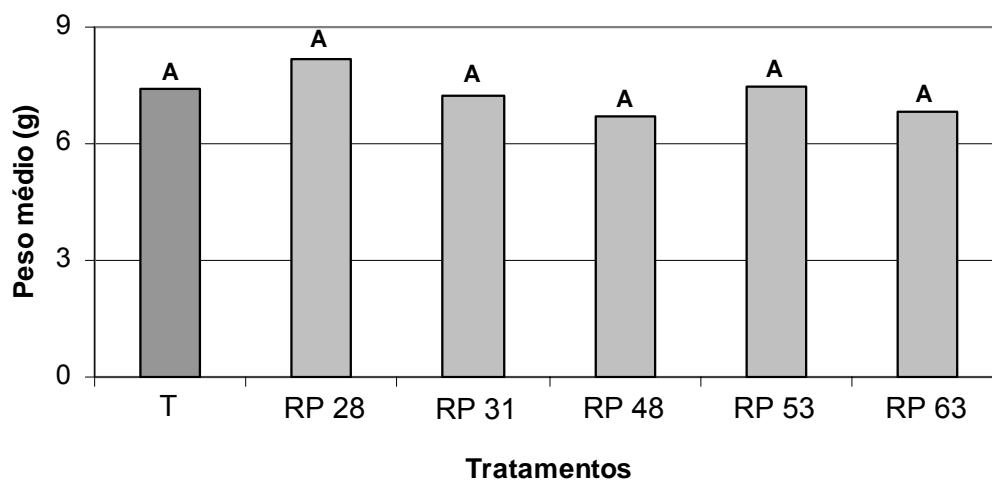


Figura 17 - Média do peso de sementes por plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas por rizobactérias e em condições de campo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

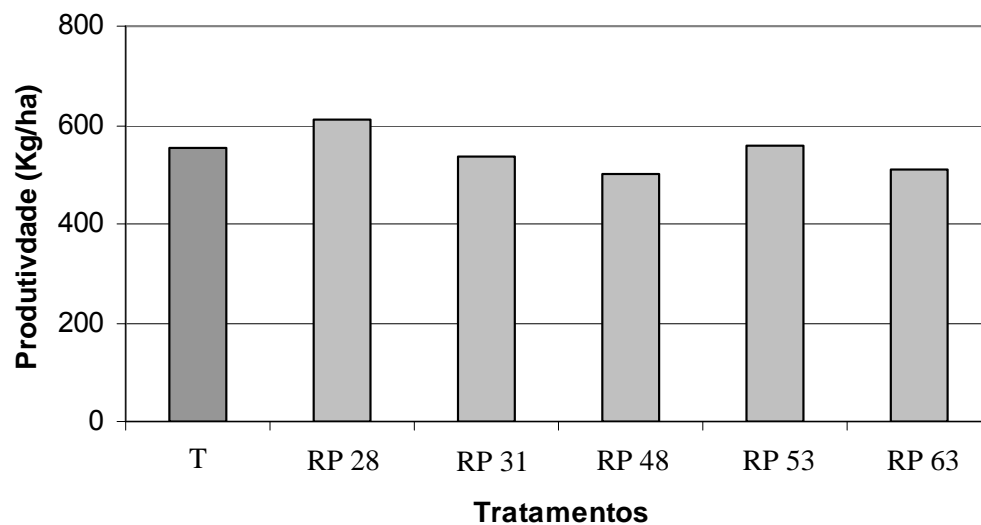


Figura 18 - Produtividade média esperada de plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizadas por rizobactérias e em condições de campo. Os valores apresentados correspondem à extrapolação dos resultados obtidos de peso médio de sementes por planta.

4. CONCLUSÕES

Na seleção massal, em casa-de-vegetação, pré-selecionaram-se os isolados UFV-RP 28 e UFV-RP 31 como promissores em promover o crescimento em plantas de feijoeiro, baseados em diferentes variáveis de crescimento avaliados.

No bioensaio de colonização radicular, foi observado que oito dentre todas as 200 rizobactérias possuíam colonização positiva. Porém, nenhum dos isolados previamente selecionados como promotores de crescimento demonstraram tal habilidade.

Cinquenta e cinco isolados solubilizaram fosfato em meio de cultura, dentre eles o isolado UFV-RP 28. Porém, nos testes de quantificação de enzimas fosfatases, o isolado UFV-RP 31 foi superior ao isolado UFV-RP 28.

Em campo os resultados não foram satisfatórios quanto ao incremento na produtividade da cultura, não havendo diferença entre os tratamentos onde as rizobactérias pré-selecionadas foram aplicadas via microbiolização de sementes, e testemunhas cujas sementes foram tratadas apenas com água.

5. BIBLIOGRAFIA

- ANTUNEZ, D.M., MOURA, A.B., BACARIN, M.A. & SILVA, E.G.DA. Efeito na Microbiolização de sementes de arroz desenvolvidas no campo na promoção de crescimento e nos teores de nitrogênio total. **VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**, Anais, p. 117-118, 2003.
- ASGHAR, H. N., ZAHIR, Z. A., & ARSHAD, M. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 55(2), p. 187-194, 2004.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729-770. 1998.
- BENIZRI, E. BAUDOIN, E. & GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.
- BURR, T.J., SCHROTH, M.N., & SUSLOW, T.V. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**. v. 68, p. 1377-83, 1978.
- CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O.; SILVA, H.S.A.; MOURA, A.B.; DEUNER, C.C. & BATISTA, U.G. Seleção de actinomicetos como promotores de crescimento e como indutores de resistência sistêmica em tomateiro à mancha bacteriana pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (suplemento), p. 296, 2001.
- CATTELLAN, A.J. & HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: **Tópicos em ciência do solo / Sociedade Brasileira de Ciência do solo**. Viçosa, MG, p. 213-234, 2000.

- CHAGAS, J.M., PEREIRA FILHO, I.A. & VIEIRA, C. Efeitos da Leucena e da adubação NPK sobre a cultura do feijão no cerrado. **Revista Ceres**, v. 30, p. 481-485, 1983.
- CHANWAY, C. P., & NELSON, L. M. Tissue Culture Bioassay for Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Soil Biol. Biochem.** v. 23(4), p.331-333, 1991.
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**. v. 43(1), p. 99-112, 1997.
- CHEN, Y. MEI, R.; LU, S., LIU, L., & KLOEPPER, J.W. The use of Yield increasing bacteria (YIB) as plant growth promoting rhizobacteria in chinese agriculture. **Management of Soil Borne Diseases**, ed. by R.S. UTHKHEDE & V.K. GUPTA. KALYANI, New Delhi, p.164 -184, 1996.
- DEUNER, C.C., ROMEIRO, R.S., MENDONÇA, H.L., SILVA, H.S.A. & GARCIA, F.A.O. Seleção de rizobactérias para promoção de crescimento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (suplemento), p. 280, 2001.
- ELAD, Y., & CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of pythium damping-off by bacteria. **Phytopathology**. v. 77, p. 190-195, 1987.
- EMBRAPA-CNPAF. In: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/feijao/cultivodofeijoeiro/importancia.htm#topo> 2003 (ultimo acesso em 23 de Março de 2004), 2004.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations- Agricultural Database. In: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, (último acesso em 11 de Abril de 2005), 2005.

- FONTES, L.A.N., BRAGA, L.J., & GOMES, F.R. Resposta da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à aplicação de calcário, adubo nitrogenado e fosfato, em municípios da Zona da Mata, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 12, p. 265-285, 1973.
- GAGNÉ, S., DEHBI, L., LE QUERRÉ, D., CAYER, F., MORIN, J. L., LEMAY, R., & FOURNIER, N. Increase of Greenhouse Tomato Fruit Yields by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Pgpr) Inoculated into the Peat-Based Growing Media. **Soil Biol. Biochem.** v. 25(2), p. 269-272, 1993.
- GERHARDT, P. (Ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**, Washington: American Society for Microbiology. 791p, 1994.
- GLICK, B.R., & BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**. v. 15 (2), p. 353-378, 1997.
- HARLAN, J.R. **Crops and Man**, Madison: American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. 294p, 1975.
- JEON, J. S., LEE, S. S., KIM, H. Y., AHN, T. S. & SONG, H. G. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. **Journal of Microbiology**. v. 41(4), p. 271-276, 2003.
- JOO, G. J., KIM, Y. M., LEE, I. J., SONG, K. S., & RHEE, I. K. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnology Letters**. v. 26(6), p. 487-491, 2004.
- KADO, C. I., & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, p. 969-979, 1970.

- KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: F.B. METTING, Jr. (Ed). **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. Marcel Dekker, New York, p. 255-274, 1993.
- KLOEPPER, J.W., LEONG, J. & TEINTZE, M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**. v. 286, p. 885-886, 1980.
- KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, p. 897-882, 1978.
- LANA, R.M.Q. **Fontes, doses e profundidade de aplicação de fósforo na cultura do feijão (Phaseolus vulgaris L.)**, Viçosa, UFV, 135p, 1988. (Tese de DS).
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85(6), p. 695-698, 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85(8), p. 843-847. 1995b.
- LUZ, W.C. Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de planta e de bioproteção na germinação e no rendimento de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (suplemento), p. 279, 1997.
- MAPA. In: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/estatisticas/agricultura_em_numeros_2004/03.02.12.xls (último acesso em 30 de Janeiro de 2005), 2005.

- MARTIN, J.F. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 9. p. 1-7, 1977.
- MEERA, M.S., SHIVANNA, M.B., KAGEYAMA, K. & HYAKUMACHI, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. **Crop Protection**, v. 14, n. 2, p. 123-130, 1995.
- MOURA, S.T. Aspectos econômicos da cultura do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 8(90), p. 3-6, 1982.
- RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-693, 1999.
- RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROMEIRO, R.S., TAKATSU, A., UESUGI, C.H., MOURA, A.B. & SILVA, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, 24, suplemento, 1999.
- ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos pela Microbiolização de Sementes com PGPR. **Paper read at Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes**, VI, 11a 13/09/2000, at Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, 279 p., 2001.

- SAHIN, F. & CAKMAKCI, R. "Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N-2-fixing and phosphate solubilizing bacteria." **Plant and Soil**, v. 265(1-2), p. 123-129, 2004.
- SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S. & DEUNER, C. C. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. tomato). **Paper read at Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XXXIII**, 06-11/08/2000, at Belém, Pará – Brasil, 2000.
- SUMNER, M.E. Crop responses to Azospirillum inoculation. **Adv. Soil Science**, v. 12, p. 53-123, 1990.
- TOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic in suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3499-3508, 1988.
- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.
- ZHANG, F., DASHTI, N., HYNES, R. K. & SMITH, D. L. Plant Growth-promoting Rhizobacteria and Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Growth and Physiology at Suboptimal Root Zone Temperatures. **Annals of Botany**, v. 79, p. 243-249, 1997.

CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DO FEIJOEIRO.

RESUMO

Duzentos isolados de rizobactérias foram obtidos da rizosfera e do rizoplane de plantas de feijoeiro sadias e, ou que apresentavam baixa incidência de patógenos, após preparo da suspensão do solo, diluição serial e semeio de alíquotas da suspensão em meio de cultura. Suspensão de propágulos de cada uma das rizobactérias foi usada para microbiolizar sementes de feijoeiro 'Ouro Negro', para se investigar a potencialidade de cada isolado em promover o biocontrole contra diferentes patógenos da parte aérea. Realizou-se a seleção massal por meio de inoculações em feijoeiros, com vinte dias de idade e previamente microbiolizados, com o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente etiológico do crestamento bacteriano do feijoeiro. Dentre os 15 melhores isolados, escolheram-se para a re-testagem apenas três (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63) que apresentaram as menores médias de lesões por centímetro quadrado. Adicionalmente, a fim de se verificar possíveis efeitos tóxicos diretos de todos os antagonistas sobre o patógeno desafiante e sobre outros patógenos bacterianos e fúngicos (*Pseudomonas viridiflava*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro, procedeu-se aos testes de antibiose "in vitro". Apenas quatro entre todos os isolados apresentaram antibiose direta sobre o patógeno desafiante, porém não contra os demais patógenos. Os isolados selecionados apresentaram resultado negativo em todos os ensaios de antibiose. Como características antagonísticas também avaliadas, os três isolados produziram sideróforos, entretanto, não atuaram como quitinolíticos. O isolado UFV-RP 53, por causa de sua eficiência nos ensaios em casa-de-

vegetação (seleção e re-testagem) foi o único selecionado para os ensaios de campo.

No primeiro experimento de campo foram avaliadas as severidades da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e da ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), que ocorreram naturalmente e de maneira simultânea e, em plantas tratadas com o isolado UFV-RP 53 observou-se redução de 30% da severidade de ambas as doenças, comparando-se à testemunha. No segundo experimento, novamente o isolado UFV-RP 53 mostrou-se capaz em reduzir a severidade da ferrugem, desta vez em 43%. Devido à ausência de efeitos deletérios diretos do isolado UFV-RP 53 sobre os patógenos e devido à separação espacial entre os componentes microbianos da interação, acredita-se que o controle da doença observado seja através da indução de resistência.

ABSTRACT

With use of soil dilution technique 200 rhizobacterial isolates were obtained from rhizosphere and rhizoplane of healthy looking bean plants. Bean seeds ('Ouro Negro') were microbiolized with the propagule suspension of each isolate and sown in non-sterile soil in pots in the greenhouse. Plants were inoculated with the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* for selection of potential antagonists capable of promoting biocontrol by induced resistance. The disease control was estimated by counting the number of lesions per square centimeter of the leaf. In the initial screening 15 isolates were selected, and in the second run of the trial this number was reduced to three rhizobacteria - UFV-RP 48, UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) and UFV-RP 63. Additionally, the antagonistic potential of all isolates was determined, by the double layer antibiosis bioassay, against fungal and bacterial bean pathogens (*Pseudomonas viridiflava*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Colletotrichum lindemuthianum*). Only four isolates showed antagonistic activity against the challenging pathogen, but none of the isolates selected earlier showed antagonistic activity. The three selected isolates produced siderophores but showed no chitinolytic activity. Based on the efficiency in greenhouse trials as biocontrol agent, the Isolate UFV-RP 53, was selected for two field experiments. In the first experiment, the natural occurrence of angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) and rust (*Uromyces appendiculatus*) was 30% less in plots sown with seeds treated with this isolate while in the second experiment, this isolate reduced rust severity by 43%. The absence of direct antagonism of UFV-RP 53 against bean pathogens, the protection against two diseases along with the fact that the antagonist was delivered to the rhizosphere and diseases occurred in the aerial parts suggest that the observed biocontrol displays characteristics of induced resistance.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de o Brasil ser considerado o maior produtor mundial de feijão, a produção poderia ser muito maior. Além das perdas provocadas pelo uso errôneo de práticas de manejo, diversas doenças de diferentes etiologias constituem-se em causas principais que limitam a produtividade no Brasil (Paula Júnior & Zambolim, 1998).

Entre as principais doenças ocorridas no Brasil, a mancha angular, o crestamento bacteriano, a antracnose e a ferrugem têm sido consideradas como as mais destrutivas, provocando perdas consideráveis, variando entre 50 a 70% em condições favoráveis (Sartorato & Rava, 1994; do Vale & Zambolim, 1997).

Dentre as várias práticas de manejo recomendadas, na maioria dos casos, o controle de enfermidades do feijoeiro é feito pelo uso de produtos químicos, à guisa de defensivos (do Vale & Zambolim, 1997). Relata-se consumo médio anual de aproximadamente 800 toneladas de fungicidas (Campanhola e Bettiol, 2003), afora os demais produtos químicos.

No entanto, com o maior conhecimento adquirido pelo homem a respeito das conseqüências causadas pelos agroquímicos, que em diversos casos causam sérios impactos ambientais e intoxicações aos seres humanos e animais, a sociedade exige cada vez mais produção de alimentos sem resíduos químicos. Desta maneira, tem-se buscando alternativas ao uso dos pesticidas.

Uma alternativa é o controle biológico (Bettiol, 1999; Nordlund, 1996; Romeiro *et al.*, 1997), que, em linhas gerais caracteriza-se pela introdução de um microrganismo não-patogênico para controlar um outro microrganismo, por sua vez, patogênico. Diversas espécies de microrganismos (fungos, bactérias e leveduras) têm sido descritas como agentes de controle biológico em diferentes culturas e atuando em diferentes locais nas plantas: rizosfera, filoplano, protegendo frutos na pós-colheita, dentre outros (El-Katatny *et al.*, 2000,

Romeiro *et al.*, 2000; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004, Elad *et al.*, 1994; Zang *et al.*, 2004).

Microrganismos podem atuar no controle biológico de maneira direta, promovendo antibiose, parasitismo, competição por nutrientes e sítios de alimentação, predação, etc. Indiretamente, o controle biológico de enfermidades de plantas pode também ser conseguido pelo estímulo apropriado dos mecanismos de resistência a enfermidades da própria planta, através de sinais bioquímicos e metabólitos produzidos pelos agentes de controle biológico. Neste contexto, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPRs) podem ser consideradas como importantes agentes de controle biológico.

Silva *et al.* (2001) isolaram 500 rizobactérias de rizoplane e rizosfera de tomateiro e testaram-nas, uma a uma, para o biocontrole de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e encontraram rizobactérias capazes de reduzir a severidade da doença em até 70%. Liu *et al.* (1995a), constataram que rizobactérias do gênero *Pseudomonas* induziram resistência sistêmica contra murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em plantas de pepino. Em outro experimento, Liu *et al.* (1995b), constataram que rizobactérias do gênero *Serratia* controlaram a mancha angular, em plantas de pepino, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, concluindo que as rizobactérias induziram resistência sistêmica. Jeun *et al.* (2004) trabalharam com rizobactérias pré-selecionadas como indutoras de resistência sistêmica contra *Colletotrichum orbiculare*, em plantas de pepino e verificaram uma redução significativa, cerca de 40% no desenvolvimento da doença nas plantas tratadas com rizobactérias, em relação à testemunha não microbiolizada. Plantas após serem expostas a agentes de indução, tais como as rizobactérias, têm seus mecanismos de defesa ativados sistemicamente (Kloepper *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004).

Baseados nos relatos descritos sobre a potencialidade do uso de rizobactérias no controle biológico, 200 rizobactérias, obtidas de rizosfera e rizoplane de plantas sadias de feijoeiro, foram avaliadas quanto ao efeito

antagonístico direto sobre diferentes patógenos e quanto ao potencial em promover o biocontrole de doenças da parte aérea do feijoeiro em condições de casa-de-vegetação e em campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem, cultivo e preservação dos microrganismos.

Nos ensaios de seleção de rizobactérias para o biocontrole, utilizaram-se as mesmas rizobactérias (200 antagonistas) isoladas para os ensaios de promoção de crescimento, conforme metodologia descrita no item 2.1 do capítulo 1.

Todas as culturas de microrganismos fitopatogênicos, fungos e bactérias, utilizados nos ensaios em casa-de-vegetação e em condições de campo, foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Bactérias fitopatogênicas foram cultivadas e preservadas, por repicagens periódicas tubo a tubo, em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Foram também preservadas por emulsificação em glicerina a 15% (Gerhardt, 1994), seguindo-se de armazenamento a -80°C .

Isolamentos fitopatogênicos de fungos foram cultivados em meio de BDA (Tuite, 1969) e preservados em solo estéril, em conformidade com técnica descrita por (Smith & Onions, 1994).

Isolados de rizobactérias foram cultivadas e preservadas por meio de repicagens periódicas (Romeiro, 2001) em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) para o uso contínuo nos ensaios realizados. Os isolados pré-selecionados como agentes de biocontrole foram paralelamente preservadas por emulsificação em glicerina a 15% (Gerhardt, 1994), seguindo-se armazenamento a -80°C .

2.2. Microbiolização de sementes.

Sementes de feijoeiro 'Ouro Negro' foram microbiolizadas por embebição (Romeiro, 2000; Silva *et al.*, 2000). Para tal, fez-se uma suspensão de propágulos de cada uma das duzentas rizobactérias isoladas ($OD_{540} = 0,5$), pela adição de água esterilizada nos tubos de ensaio ou em placas de Petri contendo as culturas bacterianas previamente repicadas e em fase exponencial (24 horas). As sementes de feijoeiro, após desinfestação superficial (álcool 70%/30s e NaClO 4%/2min) foram imersas na suspensão bacteriana, mantidas sob agitação à temperatura ambiente, por 12 horas, sendo em seguida plantadas.

2.3. Seleção massal e re-testagem dos antagonistas de *X. a. pv. phaseoli* em casa-de-vegetação

Realizou-se a seleção massal por meio de inoculações com o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith), agente etiológico do crestamento bacteriano do feijoeiro.

Sementes de feijoeiro 'Ouro negro' foram microbiolizadas por embebição (12h) em uma suspensão de propágulos de cada uma das 200 rizobactérias isoladas ($OD_{540} = 0,5$) e postas a germinar em copos plásticos (300mL) contendo mistura de solo, areia e esterco (3:3:1) não esterilizado, em casa-de-vegetação, conforme Silva *et al.*, (2001). Vinte dias após o semeio, as plantas foram levadas à câmara de nevoeiro (24h) e, em seguida, inoculadas por atomização com uma suspensão bacteriana do patógeno desafiante ($OD_{540} = 0,4$), sendo mantidas novamente na câmara de nevoeiro por igual período de tempo. Retornaram-se as plantas para a casa-de-vegetação e, após o aparecimento das lesões, procedeu-se à contagem das mesmas (Pereira *et al.*, 1999). Para cada antagonista testado, avaliaram-se 5 repetições. Os resultados obtidos foram expressos em

lesões por centímetro quadrado. Para se determinar a área foliar de cada tratamento, utilizou-se o medidor LI-COR, modelo 3100.

Os principais antagonistas selecionados foram re-testados para a confirmação dos resultados, utilizando-se 6 repetições, cada repetição constituída de 3 plantas, sendo avaliadas ao todo 18 plantas para cada antagonista.

2.4. Antibiose: método da dupla camada (Vidaver *et al.*, 1972).

Em placas de Petri contendo meio de cultura 523 sólido foram repicados, por pontos equidistantes, quatro isolamentos de rizobactérias, seguindo-se a incubação por 24 h a 25°C. Decorrido o período de incubação, as colônias formadas foram inativadas pela exposição à luz ultravioleta e exposição a vapores de clorofórmio durante 1 hora, pela volatilização do produto. Cada placa recebeu uma sobre-camada de meio semi-sólido 523 fundente contendo uma alíquota do patógeno desafiante. Para tal, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi cultivada em tubos de ensaio contendo o meio 523 líquido, por 24h a 28°C. Em seguida, uma alíquota de 100µL foi retirada do tubo com a cultura crescida e em fase exponencial, esta foi adicionada em Erlenmeyer contendo 100mL do mesmo meio, semi-sólido fundente. Após novo período de incubação (24-48h), avaliou-se a capacidade das rizobactérias em promover antibiose pela formação ou não de halos de inibição.

Realizaram-se também outros ensaios de antibiose, utilizando-se os cinco principais antagonistas selecionados contra outros diferentes patógenos: *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges), patógenos bacterianos e, *Fusarium solani* (Burkholder), *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) e *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner (4 isolados), patógenos fúngicos.

As rizobactérias foram semeadas, incubadas e inativadas, conforme metodologia descrita acima. Para os patógenos bacterianos se procedeu igualmente ao ensaio realizado para *X. a. pv. phaseoli*. No caso dos patógenos fúngicos, estes foram crescidos em meio BDA (Tuite, 1950) por 15 dias a 24°C e, fragmentos miceliais e esporos formados foram depositados em Erlenmeyer contendo BDA semi-sólido fundente, vertidos em seguida, formando a dupla camada. Novamente, transcorrido o período de incubação, avaliou-se a presença ou não de halos de inibição.

2.5. Potencial antagonístico: produção de sideróforos e quitinase.

Como estudo complementar sobre o potencial antagonístico dos isolados de rizobactérias selecionados, além dos testes de antibiose, também realizaram-se os testes para a produção de sideróforos e produção de quitinase.

Para se determinar a capacidade dos isolados em produzir sideróforos, utilizou-se o método de Schwynn & Neilands (1987) modificado. Os isolados foram cultivados em Erlenmeyer contendo 10 mL de meio Tripticaseína de soja (TSL) e incubados por 48h a 28°C, sob agitação. Após, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 G. Retirou-se uma alíquota de 1mL do sobrenadante transferido-a para um tubo de ensaio contendo 1mL de solução de Cromo azurol S (CAS). Após 15 minutos, observou-se a viragem da coloração do meio de azul para amarelo-alaranjado, quando o isolado foi produtor de sideróforo.

Nos ensaios para se determinar produção de quitinase, as rizobactérias foram semeadas, por pontos equidistantes, em placas de petri contendo o meio MLN (Gerhardt, 1994) retirando-se as fontes de carbono e adicionando-se 8g/L de quitina coloidal como única fonte de carbono, NH_4NO_3 (0,78g/L) e Ágar (18g/L). Incubaram-se as placas por 10 dias a 28°C e, avaliou-se a presença de halos ao redor das colônias, sendo neste caso, os isolados considerados quitinolíticos.

2.6. Experimentos de campo.

Os experimentos a campo foram montados entre os meses de outubro de 2004 a fevereiro de 2005 (dois ensaios), em áreas distintas, porém, ambas preparadas segundo as recomendações técnicas (Araújo *et al.*, 1996) e adubadas conforme Ribeiro *et al.* (1999). A adubação de cobertura foi realizada 40 dias após a germinação, utilizando-se sulfato de amônio.

No primeiro e segundo experimento foram utilizadas sementes de feijoeiro 'Pérola' e 'Ouro Negro', respectivamente. Plantaram-se 15 sementes por metro linear, com espaçamento de 0,5 m entre linhas, constituindo-se três tratamentos: plantas provenientes de sementes microbiolizadas com suspensão da rizobactéria antagonista UFV-RP 053 ($OD_{540} = 0,5$), plantas oriundas de sementes tratadas apenas com água (testemunha) e plantas pulverizadas semanalmente com fungicida clorotalonil, no primeiro experimento e, oxicloreto de cobre no segundo.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela foi composta por uma fileira contendo 10 plantas.

Ao longo do ciclo da cultura, avaliou-se a severidade das doenças que ocorreram naturalmente nas plantas, quantificando-se semanalmente, a porcentagem de área foliar lesionada de toda a planta, pelo uso de escalas diagramáticas (Godoy *et al.*, 1997).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica®, versão 6.0, procedendo-se ao teste de média de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A área abaixo da curva de progresso de doenças (AACPD) foi calculada utilizando-se as fórmulas contidas em Madden (1983).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção de antagonistas para o biocontrole.

Nos ensaios para a seleção massal dos antagonistas, observou-se redução do número de lesões/cm², em relação à testemunha, em 15 dos tratamentos cujas sementes de feijoeiro 'Ouro Negro' foram microbiolizadas pelas rizobactérias (Figura 1).

Dentre os 15 melhores isolados, escolheram-se para a re-testagem apenas três (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63), que apresentaram o melhor desempenho (Figura 1).

Na re-testagem, junto a estes isolados, somaram-se outros dois, os isolados UFV-RP 28 e UFV-RP 31, selecionados previamente como promotores de crescimento (capítulo 1). Contudo, o isolado UFV-RP 28 também figurou entre os 15 melhores isolados no primeiro ensaio de biocontrole (Figura 1). Após a quantificação do número de lesões nos diferentes tratamentos avaliados e, após realizarem-se as análises comparativas, observou-se que apenas o isolado UFV-RP 53 foi superior à testemunha, diferindo-se estatisticamente dela a 5% de probabilidade (Figura 2), causando 50% de redução da severidade do crescimento bacteriano.

O isolado UFV-RP 53 obteve resultados estáveis durante todas as fases do processo seletivo, indicando tratar-se de um potencial agente de controle biológico do crescimento bacteriano em relação ao tratamento controle, tanto quando comparado o controle, quanto em relação aos demais isolados. Assim, o isolado UFV-RP 53 foi o único selecionado para os ensaios de biocontrole em condições de campo.

Estes resultados encontram suporte em diferentes relatos do uso de rizobactérias como agentes de controle biológico descritos por outros

pesquisadores (Leeman *et al.*, 1995; Ongena *et al.*, 2000; Zanatta *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2002; Kloepper *et al.*, 2004).

Devido à ausência de efeitos deletérios diretos das rizobactérias sobre o patógeno (conforme resultados apresentados no item 3.3) e devido à separação espacial entre os componentes microbianos da interação, acredita-se que o controle da doença, obtido nos tratamentos com as rizobactérias UFV-RP 53, seja através da indução de resistência sistêmica (Van Loon *et al.*, 1998).

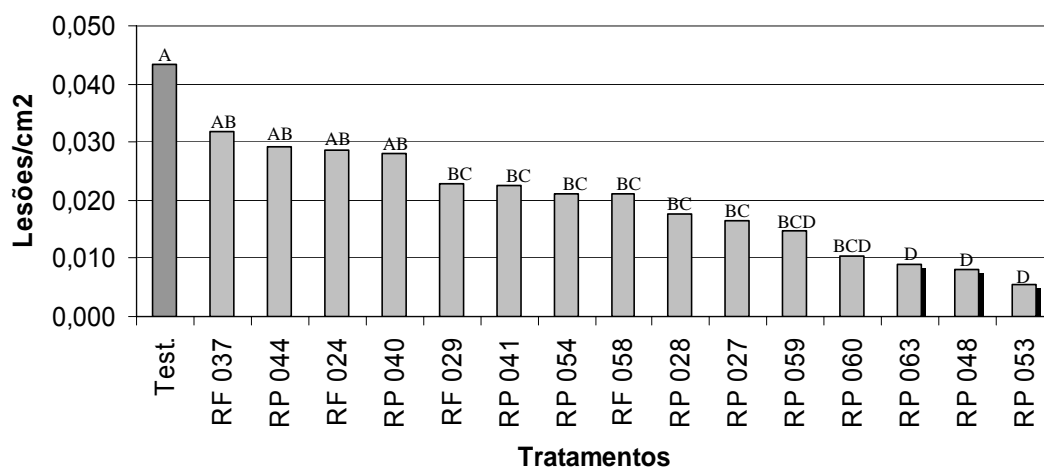


Figura 1 - Número médio de lesões por cm² causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' oriundas de sementes microbiolizadas com diferentes rizobactérias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

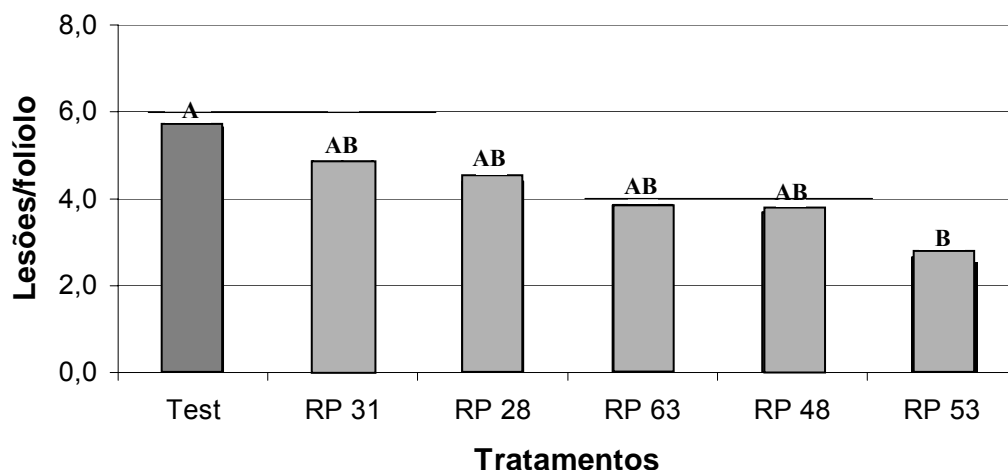


Figura 2 – Média de lesões de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* por folículo de feijoeiro 'Ouro Negro' previamente microbiolizados por rizobactérias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2. Antibiose.

Quatro, entre as duzentas rizobactérias avaliadas, apresentaram efeito direto "in vitro", produzindo algum tipo de substância tóxica com efeito direto sobre o patógeno desafiante *X. a.* pv. *phaseoli*. As rizobactérias que inibiram o crescimento do patógeno, formando o halo de antibiose foram UFV-RF 50, UFV-RF 59, UFV-RP 92 e UFV-RP 97.

Nenhuma das rizobactérias selecionadas como agentes de biocontrole promoveu antibiose direta contra o patógeno desafiante ou mesmo contra os demais patógenos bacterianos (*P. viridiflava*, *C. f.* pv. *flaccumfaciens*) e fúngicos (*F. solani*, *S. rolfii* e *C. lindemuthianum*) testados, sugerindo a ausência de efeitos tóxicos danosos sobre os mesmos.

Vieira-Júnior *et al.*, (2004a), em ensaios realizados com o mesmo patógeno desafiante verificaram que, dentre três isolados de residentes de filoplano pré-selecionados para o biocontrole de doenças da parte aérea do feijoeiro, um

isolado que não teve efeito inibitório contra o patógeno foi o mais efetivo no controle de *X.a. pv. phaseoli* em casa-de-vegetação.

Um dos critérios básicos descritos por Steiner e Schönbeck (1995), é que para se selecionar um agente de biocontrole, indutor de resistência, espera-se haver a ausência de ação direta deste sobre o patógeno.

3.3. Produção de sideróforos e quitinase.

No ensaio de produção sideróforos, para todos os 5 isolados de rizobactérias avaliados, a produção ocorreu. Entretanto, não foram quantificadas e nem tampouco determinados quais os tipos de sideróforos produzidos.

A produção de sideróforos pelos antagonistas é uma característica desejável para o estabelecimento destes em condições de campo, aumentando a competitividade e contribuindo com a sobrevivência dos mesmos junto aos demais microrganismos presentes no solo (Weller, 1988; Kumar e Dube, 1992).

Ao contrário, no ensaio de produção de quitinase, não houve formação de halos circundando as colônias em nenhuma das placas onde foram repicadas as rizobactérias, concluindo-se que estas não são capazes de degradar a quitina.

3.4. Ensaios de campo.

No experimento 1, foram avaliadas as severidades da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris) e da ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*), que ocorreram naturalmente e de maneira simultânea.

Observou-se, que o isolado UFV-RP 53 aplicado via microbiolização de sementes às plantas de feijoeiro 'Pérola', foi capaz de protegê-las, reduzindo em 30% a severidade de ambas as doenças (Figuras 3, 4, 5 e 6). Não houve, neste

ensaio, diferença entre o tratamento com a rizobactéria UFV-RP 53 e o tratamento com o fungicida clorotalonil, aplicado semanalmente, em relação à mancha angular (Figuras 5 e 6). Já em relação à ferrugem, apesar de haver diferença significativa entre os tratamentos (UFV-RP 53 x clorotalonil), não se fizeram comparações quanto à eficiência no controle da ferrugem, visto a não adoção do clorotalonil para o controle específico da doença (Figuras 3 e 4).

No segundo experimento, apenas a ferrugem ocorreu naturalmente. Reafirmando os resultados anteriores, o isolado UFV-RP 53 foi capaz de reduzir a severidade da ferrugem em 43% (Figuras 7 e 8) em relação à testemunha. Comparando-se os resultados entre, os obtidos para a rizobactéria UFV-RP 53 e os resultados do controle químico (oxicloreto de cobre) aplicado semanalmente, este se mostrou superior, diferindo-se estatisticamente e alcançando níveis de controle de aproximadamente 83% (Figuras 7 e 8).

Nota-se uma relativa diferença no controle da ferrugem observado entre os dois experimentos. Conforme descrevem Steiner e Schönbeck (1995), a indução de resistência pode ser determinada pelo genótipo da planta, pressupondo significantes diferenças no nível e tipo de resistência quando da utilização de diferentes cultivares.

Observaram-se em ambos os experimentos que plantas microbiolizadas com o isolado UFV-RP 53 restringiram os patógenos, atrasando a sua ocorrência e/ou estabelecimento e, reduziram a taxa de progresso e a severidade da doença.

Comparado com os tratamentos químicos tradicionais utilizados, observou-se um controle significativo por parte do isolado UFV-RP 53, ressaltando-se o emprego semanal dos fungicidas em detrimento a uma única aplicação do antagonista. Fugindo do escopo deste trabalho, vislumbra-se a aplicação conjunta de ambos os tratamentos, salvo os diferentes locais de aplicação (rizosfera e rizoplano) e os devidos estudos de compatibilidade entre antagonista e produtos químicos.

Visando reduzir o número de aplicações e a grande diversidade dos produtos químicos empregados na cultura do feijoeiro, visto que a cultura figura entre as maiores consumidoras de agrotóxicos no país (Campanhola & Bettiol, 2003), o uso de bons agentes de biocontrole pode ser uma alternativa viável a somar no manejo integrado de doenças na cultura, contribuindo com a prática de uma agricultura ecologicamente correta.

Devido a sua eficiência em promover o biocontrole, o isolado UFV-RP 53 foi enviado para identificação, por análise de ácidos graxos e sequenciamento rRNA 16S, sendo identificado como *Pseudomonas putida*.

Em 1966, Klement e colaboradores já relatavam bactérias do gênero *Pseudomonas* induzindo resistência em fumo contra o vírus TMV, inibindo sua multiplicação. Hoffland et. al. (1996) descreveram indução de resistência em rabanete, contra diferentes patógenos, mediada por *Pseudomonas fluorescens*. Há também relatos de indução de resistência em feijoeiro contra *Colletotrichum lindemuthianum* (Bigirimana & Hofte, 2002). Existem, inclusive, no mercado internacional produtos formulados a base de rizobactérias do gênero *Pseudomonas*, tais como BlightBan A506, Cedomon, dentre outros, para o uso no controle biológico de doenças.

Ainda assim, muito se tem questionado quanto à eficiência de microrganismos selecionados em casa-de-vegetação e sua potencialidade de uso em condições de campo.

Desta forma, apesar do isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) ter-se mostrado eficiente em controlar diferentes patógenos, em casa-de-vegetação e em condições de campo, outros experimentos deverão ser montados e repetidos, tanto no tempo como no espaço, utilizando-se outros cultivares e também avaliado frente a outros patógenos importantes para a cultura (Romeiro et al, 2000).

Finalmente, apesar do isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) ter-se mostrado eficiente em controlar diferentes patógenos da parte aérea do feijoeiro,

deve-se avançar nos estudos e ampliar os conhecimentos relacionados ao antagonista, tais como sobrevivência, veiculação, dosagem, dentre outros. Além, outros experimentos deverão ser montados e repetidos, tanto no tempo como no espaço, utilizando-se outros cultivares e também confrontado com outros patógenos também importantes para a cultura do feijoeiro.

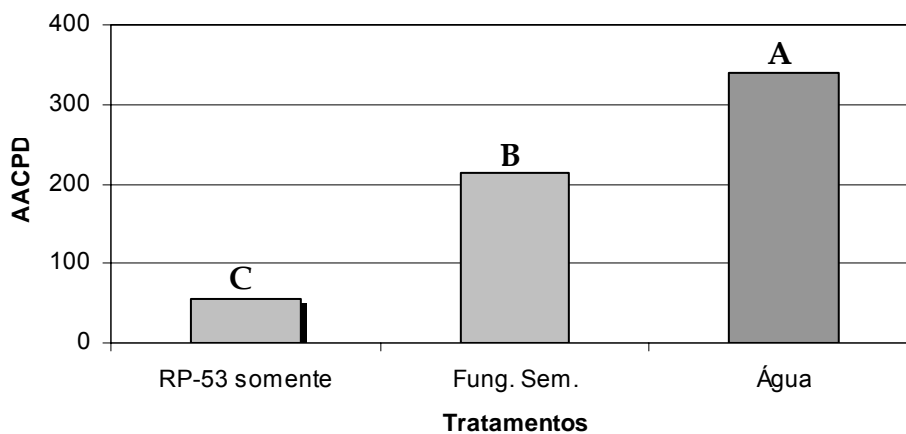


Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro 'Pérola' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância (1º Experimento).

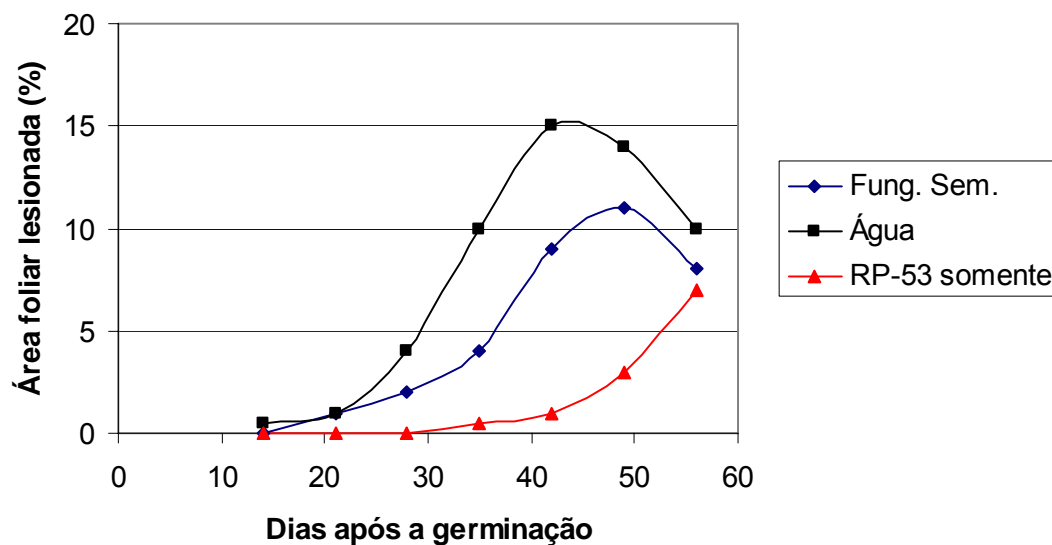


Figura 4 - Curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro 'Pérola' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água (1º Experimento).

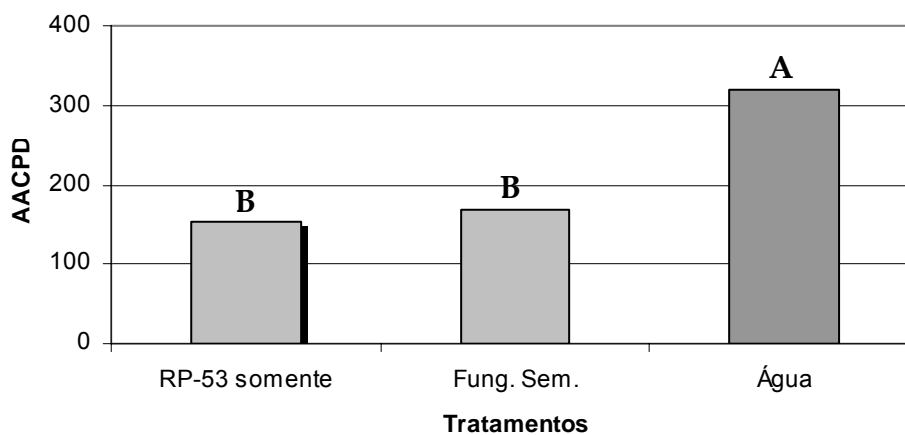


Figura 5 - Área abaixo da curva de progresso da mancha angular em plantas de feijoeiro 'Pérola' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância (1º Experimento).

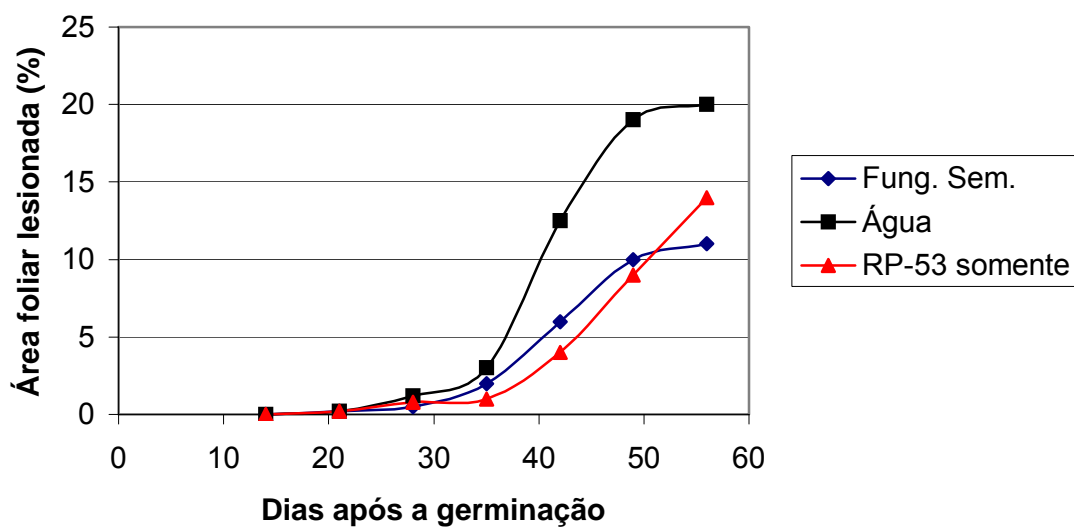


Figura 6 - Curva de progresso da mancha angular em plantas de feijoeiro 'Pérola' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água (1º Experimento).

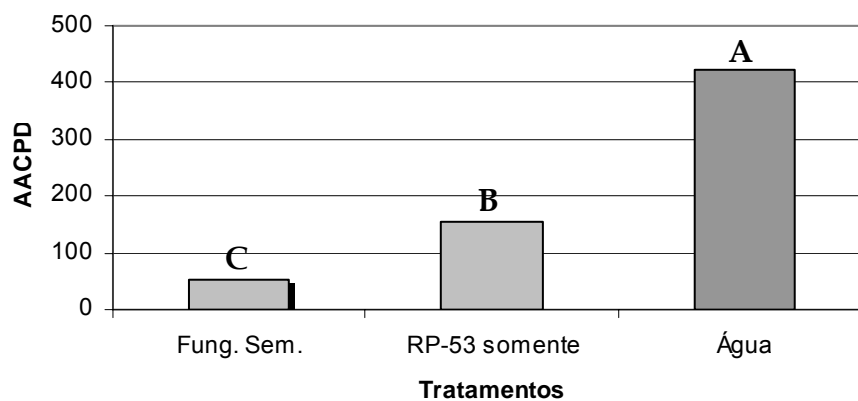


Figura 7 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro 'Ouro Negro' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância (2º Experimento).

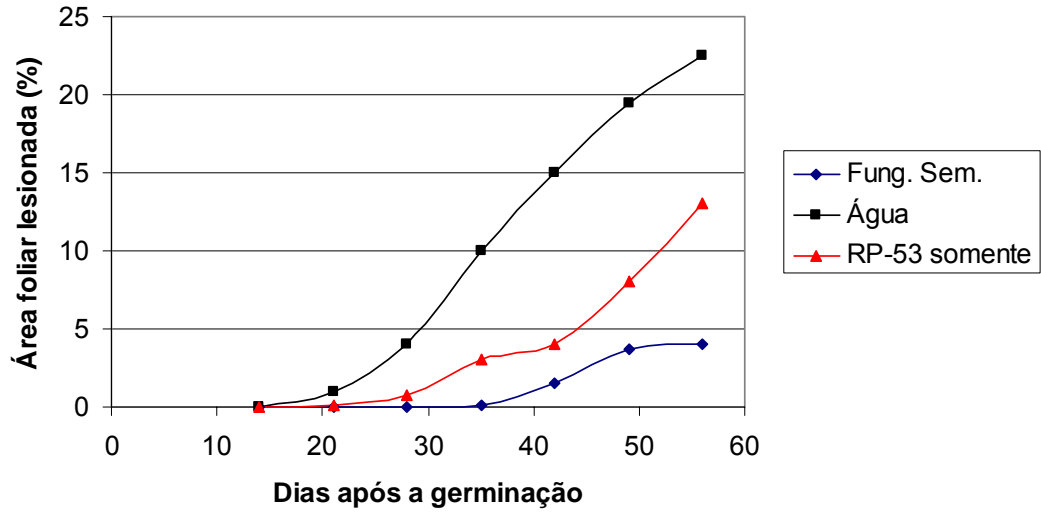


Figura 8 - Curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro 'Ouro negro' microbiolizadas com rizobactéria UFV-RP 53, pulverizadas com fungicida semanalmente (fung. sem.) e tratadas com água (2º Experimento).

4. CONCLUSÕES

Na seleção massal dos antagonistas para o biocontrole em feijoeiro frente ao patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em casa-de-vegetação, obtiveram-se três isolados promissores (UFV-RP 48, UFV-RP 53 e UFV-RP 63), mas apenas o isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) foi efetivo na re-testagem, reduzindo em quase 50% a severidade da doença, sendo então selecionado para os ensaios de campo.

Não se verificou efeito tóxico direto, através dos ensaios de antibiose “in vitro”, entre nenhum dos isolados selecionados e os diferentes patógenos avaliados, em todas as possíveis combinações.

Todos os isolados pré-selecionados produziram sideróforos, característica desejável para um bom antagonista. Entretanto, na avaliação da produção de quitinases, uma outra característica potencial antagonística, os isolados não degradaram a quitina, sendo considerados desta forma, não quitinolíticos.

O isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) foi avaliado em dois experimentos de campo, quantificando-se a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), ambas de ocorrência natural. No primeiro experimento, observou-se redução de 30% na severidade da mancha angular e 30% na severidade da ferrugem. No segundo, onde apenas a ferrugem ocorreu, foi observada uma redução de 43% na severidade da doença.

Observou-se o controle significativo das doenças nos tratamentos com o isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) em relação ao controle químico aplicado semanalmente, considerando-se uma única aplicação do antagonista.

5. BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 786p., 1996.
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças. **Ação Ambiental**. N. 5, Ano II, 1999.
- BIGIRIMANA, J. & HOFTE, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. **Phytoparasitica**, v. 30(2), p. 159-168, 2002.
- CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (eds.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 279p., 2003.
- DO VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de Plantas : grandes culturas**, v. 1, 554p., Viçosa, MG, 1997.
- ELAD, Y.; KÖHL, J. & FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, v. 84, p. 1193, 1994.
- EL-KATATNY, M. H.; SOMITCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M. S. & GUBITZ, G. M. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopatogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food technology and Biotechnology**, v.38, n.3, p.173-180, 2000.
- GERHARDT, P. (ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**, 791p. Washington: American Society for Microbiology, 1994.

- GODOY, C. V.; CARNEIRO, S. M.T. P. G.; IAMUTI, M. T.; PRIA, M.D.; AMORIM, L.; BERGER, R. D. & BERGAMIM FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 104, n.4, p. 336-345, 1997.
- HALFELD-VIEIRA, B. A., ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 6, p.638-643, 2004.
- HOFFLAND, E., HAKULINEN, J., PELT, J. A. VAN & VAN PELT, J. A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, v. 86(7), p. 757-762, 1996.
- JEUN, Y.C., PARK, K.S., KIM, C.H., FOWLER, W.D. & KLOEPPER, J.W. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. **Biological Control**. v. 29, p. 34-42, 2004.
- KADO, C. I., & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60: p. 969-979, 1970.
- KLEMENT, Z., KIRÁLY, Z. & POZSAR, B. Supression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophyte bacterium. **Acta Phytopathologica Hungariae**, v. 1, p. 11-18, 1966.
- KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., ZEHNDER, G.W. & WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria taht induced systemic resistance - Historical precedence. **Phytopathology**, v. 87, p. 136-137, 1997.

- KLOEPPER, J. W., RYU, C. M. & ZHANG, S. A. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94 (11), p. 1259-1266, 2004.
- KUMAR, B. S. D., DUBE, H. C. Seed bacterization with a fluorescent pseudomonas for enhanced plant growth, yield and disease control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.539-542, 1992.
- LEEMAN, M., VANPELT, J. A., DENOUDEN, F. M., HEINSBROEK, M., BAKKER, P. A. H. M. & SCHIPPERS, B.. Induction of Systemic Resistance against Fusarium-Wilt of Radish by Lipopolysaccharides of *Pseudomonas-Fluorescens*. **Phytopathology**, v. 85(9), p. 1021-1027, 1995.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**. v. 85(6), p. 695-698, 1995a.
- LIU, L., KLOEPPER, J.W., & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85(8), p. 843-847, 1995b.
- MADDEN, L. V. Measuring and modeling losses at the field level. **Phytopathology**, v. 73, n.11, p. 1591-1596, 1983.
- NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v. 17(2), p. 35-44, 1996.
- ONGENA, M., DAAYF, F., JACQUES, P., THONART, BENHAMOU, P., PAULITZ, N. T. C. & BELANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, v. 49 (4), p. 523-530, 2000.

- PAULA JÚNIOR, T.J. DE, & ZAMBOLIM, L. Doenças. In: **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no estado de Minas Gerais**, ed. by VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T. J. D. & BORÉM, A. Viçosa-MG: Ed. UFV, 1998.
- PEREIRA, J. L. A., OLIVEIRA, J. R. , ROMEIRO, R. S., BROMMONSCHENKEL, S. H. & SILVA, I. T. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Paper read at Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 01-06/08/1999, at Curitiba, PR – Brasil, 1999.
- RIBEIRO, A.C., GUIMARÃES, P.T.G. & ALVAREZ, V.V.H. (ed.) **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais- 5ª. aproximação**, Viçosa, CFSEMG, 359p., 1999.
- RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROMEIRO, R.S., NEVES, D. M. S., CARVALHO, M. G. & CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, 279 p., 2001.
- ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos pela Microbiolização de Sementes com PGPR. **Paper read at Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, VI**, 11a 13/09/2000, at Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.
- ROMEIRO, R.S., MOURA, A.B., MATSUOKA, K. & FERNANDES, M.C. Actynomicetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia*

solanacearum) and growth promotion after seed microbionization. **89^a Annual Meeting of The American Phytopathological Society**. August, p. 9-13, 1997.

SARTORATO, A. & RAVA, C. A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular e nas perdas da produção do feijão comum (*P.vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 247-251, 1992.

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

SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S. & BATISTA, G. Biocontrole experimental da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) - antagonismo microbiano ou indução de resistência sistêmica? **Paper read at Congresso Paulista de Fitopatologia, XXIV**, 06-08/02/2001, at Piracicaba, SP - Brasil, 2001.

SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S. & DEUNER, C. C. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. tomato). **Paper read at Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XXXIII**, 06-11/08/2000, at Belém, Pará - Brasil, 2000.

SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S., CARRER FILHO, R., PEREIRA, J. L. A., MIZUBUTI, E. S. G., MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v. 152, p. 371-375, 2004.

SMITH, D. & ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungii**, 122p., Surrey: International Mycological Institute, 1994.

Steiner, U, & Schönbeck, F. Induced disease resistance in monocots. Pg 86-110.

In: **Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology)** ed. by HAMMERSCHMIDT, R. & KUC, J. Kluwer Academic Pub., Dordrech. 182p., 1995.

SYLVESTER-BRADLEY, R., ASAKAWA, N., LA TORRACA, S., MAGALHÃES, F. M. M., OLIVEIRA, L. AND PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods**ed, Minneapolis: Burgess Pub. Company. 239p., 1969.

VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VIDAVER, A. K.; MATHYS, M. L.; THOMAS, M. E. & SCHUSTER, M. L, Bacteriocins of phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. phaseolicola*, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 705-713, 1972.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S.; LANNA FILHO, R. & MENDONÇA, H. L. Residentes de filoplano bacterianos como agentes de biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 76, 2004a. (Resumo).

YAN, Z. N., REDDY, M. S., RYU, C. M., MCINROY, J. A, WILSON, M. & KLOEPPER, J. W. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.92(12), p.1329-1333, 2002.

ZANATTA, Z.G.C.N., MOURA, A.B., SANTOS, A.S., BUCK, A.C.A. Avaliação de bactérias biocontroladoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27(suplemento), p. 231-232, 2002.

ZHANG, S., REDDY, M. S. & KLOEPPER, J. W. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. **Plant and Soil**, v. 262(1-2), p. 277-288, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

Dentre os 200 duzentos isolados de rizobactérias testados quanto à capacidade de promover o crescimento em plantas de feijoeiro, pré-selecionaram-se como mais promissores os isolados UFV-RP 28, UFV-RP 31.

Nos ensaios de colonização radicular, oito das rizobactérias demonstraram tal habilidade, mas os isolados previamente selecionados como possíveis PGPRs não.

Quanto à capacidade das rizobactérias em solubilizar fosfato, cinquenta e cinco isolados obtiveram resultado positivo em meio de cultura. Neste ensaio, dentre os dois isolados pré-selecionados, apenas o isolado UFV-RP 28 formou halos de solubilização de fosfato ao redor de suas colônias.

Nos testes de quantificação de enzimas fosfatases, onde se testaram todos os melhores isolados obtidos em ambas as linhas de pesquisa, o isolado UFV-RP 31 foi superior ao isolado UFV-RP 28, mas, quem obteve o melhor resultado foi o UFV-RP 53, selecionado como indutor de resistência.

Apesar de selecionarmos dois isolados (UFV-RP 28, UFV-RP 31) como promissoras PGPRs, após seleção massal em casa-de-vegetação, em campo os resultados não foram satisfatórios quanto ao incremento na produtividade da cultura.

Nos ensaios visando o biocontrole de doenças do feijoeiro, selecionaram-se, em casa-de-vegetação, os isolados UFV-RP 48, UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) e UFV-RP 63 como mais promissores, utilizando-se como patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Entretanto, apenas o isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) foi realmente efetivo, reduzindo a severidade do cretamento bacteriano em aproximadamente 50%.

Nos ensaios de antibiose direta não houve produção, por parte dos antagonistas pré-selecionados, de nenhum composto tóxico com ação deletéria sobre os patógenos. Adicionalmente, como características antagonísticas avaliadas, todos os melhores isolados selecionados produziram sideróforos, entretanto, não se apresentaram como quitinolíticos.

Em dois experimentos em campo, o isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) demonstrou novamente seu potencial como agente de biocontrole, reduzindo em 30% a severidade da mancha angular e da ferrugem, no primeiro experimento, e, reduzindo em 43% a severidade ferrugem no segundo, acreditando-se que o controle observado esteja ocorrendo por indução de resistência sistêmica.

Contudo, apesar do isolado UFV-RP 53 (*Pseudomonas putida*) ter-se mostrado eficiente em controlar diferentes patógenos da parte aérea do feijoeiro, outros estudos e experimentos deverão ser montados e repetidos, utilizando-se novos cultivares, outros patógenos, etc. Deve-se também fazer a biocaracterização do isolado, a fim de conhecê-lo por completo. Tudo isso se faz necessário para que possamos preservar as características desejáveis do isolado e torná-lo disponível ao manejo integrado de doenças de forma segura, eficiente e sem onerar os custos, principal limitação para a maioria dos pequenos produtores.