

RIZOBACTÉRIAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS CÍTRICAS⁽¹⁾

S. S. FREITAS⁽²⁾ & C. I. AGUILAR VILDOSO⁽²⁾

RESUMO

Desenvolveram-se três experimentos em casa de vegetação para verificar a possibilidade de as rizobactérias atuarem como promotoras do crescimento de plantas cítricas. Ao todo, testaram-se 10 isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente, 13 de *Bacillus* e sete de outras bactérias rizosféricas em porta-enxertos utilizados na citricultura: tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni*), limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) e limoeiro 'Volcameriano' (*Citrus volkameriana*). Dependendo do porta-enxerto, sete isolados de *Pseudomonas*, um de *Bacillus* e um de outra bactéria rizosférica tiveram efeito benéfico sobre a matéria seca de raízes ou de parte aérea, indicando uma alta proporção de promotores de crescimento entre as bactérias do primeiro grupo. Procedeu-se também à contagem de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de bactérias não-fluorescentes em raízes de tangerineira 'Cleópatra' e de limoeiro 'Cravo', procedentes de viveiro de mudas e do campo. Ambos os grupos bacterianos tiveram sua multiplicação favorecida na rizosfera de tangerineira 'Cleópatra', em condições de viveiro.

Termos de indexação: *Citrus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., RPCPs.

SUMMARY: *RHIZOBACTERIA AND GROWTH PROMOTION OF CITRUS PLANTS*

Three greenhouse trials were carried out to verify if rhizobacteria can promote citrus plant growth. Ten isolates of fluorescent Pseudomonads, thirteen of Bacillus spp. and seven of other rhizospheric bacteria were tested in three rootstocks seedlings: 'Cleopatra' mandarin (Citrus reshni), rangpure lime (Citrus limonia) and Volkamerian lemon (Citrus volkameriana). Depending on the rootstock, seven Pseudomonads, one isolate of Bacillus and one of other rhizospheric bacteria increased the root or shoot dry weight, indicating a

⁽¹⁾ Trabalho apresentado no XXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, em Araras, de 23 a 25 de fevereiro de 2003. Parcialmente financiado pela FAPESP. Recebido para publicação em dezembro de 2002 e aprovado em setembro de 2004.

⁽²⁾ Pesquisador do Instituto Agrônomo - IAC. Caixa Postal 28, CEP: 13001-970 Campinas (SP). E-mails: sfreitas@iac.sp.gov.br

high proportion of growth promoters among the fluorescent Pseudomonads. Also, fluorescent Pseudomonads and non fluorescent bacteria were counted in the roots of nursery seedlings and field plants of Citrus reshni and Citrus limonia. The growth of both bacterial groups was favored in the Citrus reshni rhizosphere under nursery conditions.

Index terms: Citrus spp., Pseudomonas spp., Bacillus spp., PGPR.

INTRODUÇÃO

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) têm sido citadas numa série de trabalhos como beneficiadoras de uma gama de espécies vegetais. Dentre essas espécies são mais freqüentemente citadas as anuais, de pequeno porte, como abóbora (Chen et al., 2000), alface (Freitas et al., 2003), feijão (Silveira et al., 1995), trigo (Luz, 2001), etc.; todavia, há alguns relatos de promoção de crescimento em plantas perenes, como café (Freitas, 1989) e abeto, uma essência florestal (Chanway et al., 2000).

Uma das maneiras de exercer benefício, além da promoção direta do crescimento, é, indiretamente, o controle biológico de fitopatógenos, em que as formas de atuação das bactérias também podem ser variadas (Freitas & Pizzinatto, 1991). Barka et al. (2000) observaram o aumento da resistência de videiras a *Botrytis cinerea*, possivelmente associada ao aumento da produção de citocininas na rizosfera.

A citricultura ocupa uma área de 770 mil hectares no estado de São Paulo, mais de 70 % da área ocupada por essa atividade no País (FNP, 2001). Investimentos na área têm resultado em uma cultura com abertura para novas tecnologias, mas a produtividade média brasileira ainda é muito baixa em comparação com a de outras regiões produtoras (Amaro et al., 2001). Uma das possibilidades de melhorar a produtividade ou a qualidade de pomares cítricos seria o uso de rizobactérias, seja diretamente como promotoras de crescimento, seja como agentes de controle biológico de fitopatógenos, quando o efeito benéfico sobre o crescimento seria indireto. A utilização de RPCPs, diretamente ou indiretamente, teria a vantagem de diminuir a utilização de insumos químicos, com benefícios tanto de ordem econômica quanto de ordem ecológica, uma vez que tais produtos geram, freqüentemente, problemas de contaminação ambiental.

É claro que a promoção do crescimento é desejável, considerando a maioria dos pontos de vista. Em plantas anuais, o benefício, se consistir em aumento de matéria seca, poderá resultar em encurtamento do ciclo ou em aumento na produção, dependendo da espécie (Freitas et al., 2003). Em plantas perenes, uma forma de benefício seria ocorrer diminuição do período em que a muda passa em viveiro. Para plantas cítricas, especificamente,

que passam por uma fase em viveiro de mudas, em substrato com possibilidade de manipulação, seria altamente desejável obter-se um isolado bacteriano benéfico que seria acrescentado ao substrato, onde poderia desenvolver-se com vantagem, já que enfrentaria menor número de competidores. A menor competição seria resultado da desinfestação do substrato, que é normalmente utilizada pelos produtores de mudas (Borges et al., 2000). Dentre outras formas de benefício, destaca-se a solubilização de fosfatos, citada por Rodriguez & Fraga (1999), que, associada à presença de micorrizas arbusculares, pode favorecer grandemente a nutrição de plantas, principalmente as cítricas (Cardoso et al., 1986). A interação de RPCPs e micorrizas já foi observada, no Brasil, por Silveira et al. (1995), em feijão.

Em plantas que passam por uma fase de produção de mudas em viveiro seria aconselhável que a inoculação das bactérias fosse feita no substrato de modo que a colonização da rizosfera e o benefício ocorressem o mais cedo possível (Chanway et al., 2000; Sturz & Nowak, 2000).

Segundo Kloepper (1993), pertencem ao grupo fluorescente de *Pseudomonas* sp. muitos isolados de RPCPs, sendo muito freqüente o uso de isolados desse grupo em seleções de bactérias com vistas em promover o crescimento vegetal (Freitas & Pizzinatto, 1997; Chen et al., 2000; Chanway et al., 2000; Berggren et al., 2001; Cattelan, 2001; Ramamoorthy et al., 2001).

Bactérias do gênero *Bacillus* também são incluídas entre as RPCPs (Chanway et al., 2000). Tais bactérias não só apresentam algumas características favoráveis para à produção de inoculantes comerciais: como produzem endosporos, seu manuseio e aplicação seriam facilitados, inclusive em mistura com outros defensivos, desejável para o manejo ecológico de doenças e pragas, produção integrada e o sistema "approach". Outro aspecto que as inclui entre as rizobactérias agentes de controle biológico é a sua capacidade de produção de antibióticos (Freitas & Pizzinatto, 1997).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e a densidade de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* na rizosfera de diferentes espécies de plantas cítricas mantidas em condições de viveiro e de campo, bem como selecionar isolados bacterianos como promotores de crescimento de citros.

MATERIAL E MÉTODOS

Contagem de bactérias na rizosfera de plantas cítricas

Procedeu-se à contagem de bactérias fluorescentes e não-fluorescentes nas raízes de plantas cítricas de duas procedências distintas. Consideraram-se dois porta-enxertos importantes para a citricultura: a tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni*) e o limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*). Amostraram-se plantas no campo e em ambiente protegido num telado, mantidas em recipientes plásticos de forma cônica, chamados citropotes, que continham o substrato comercial à base de casca de *Pinus* ("Plantmax").

Para obter amostras no campo, o solo de um pomar, no município de Cordeirópolis (SP), com plantas em plena produção, foi cavado de maneira a expor as raízes, que foram retiradas e acondicionadas em sacos plásticos juntamente com o solo adjacente. Na amostragem das plantas em ambiente protegido, os recipientes inteiros foram levados ao laboratório. O procedimento para obter a suspensão de solo foi semelhante para todas as amostras. Consistiu na remoção do solo mais frouxamente aderido às raízes, que foram, a seguir, agitadas mecanicamente, por dez minutos, em frascos de Erlenmeyer com 100 mL de solução esterilizada 0,01 mol L⁻¹ de MgSO₄·7 H₂O. A partir dessa solução, alíquotas de diluições de fator 10 foram transferidas para placas de Petri com o meio B de King et al. (1954) e espalhadas com alça de Drigalski. Depois de 24 a 48 h de incubação a 30 °C, enumeraram-se, separadamente, as colônias que floresceram sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta e as que não floresceram nas mesmas condições. As raízes utilizadas nesse procedimento tiveram sua massa de matéria seca determinada, para possibilitar a quantificação das bactérias por massa de raízes secas.

Para cada grupo bacteriano, as análises de variância seguiram um esquema fatorial 2 x 2 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1 %. Para as análises de variância e de comparação de médias, os dados originais foram transformados em log(x + 1).

Testes de promoção de crescimento por rizobactérias

Desenvolveram-se experimentos em casa de vegetação para selecionar eventuais rizobactérias promotoras do crescimento de plantas cítricas.

No primeiro deles, utilizaram-se plantas de limoeiro 'Cravo' – usado como porta-enxerto em 90 % das plantas cítricas atualmente plantadas –, cultivadas em bandejas de produção de mudas, em "Plantmax", sistema empregado pelos produtores. "Plantmax" é um substrato à base de cascas de *Pinus*, mantido sem esterilização. Cada parcela consistiu

de quatro plântulas em células contíguas, separadas das outras por células vazias da bandeja, com quatro parcelas para cada tratamento. Os tratamentos consistiram na inoculação de 10 isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas*, 13 de *Bacillus* spp. e sete de outras bactérias rizosféricas. Todos os isolados pertencem à coleção de rizobactérias do setor de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo, em Campinas, São Paulo. A inoculação, feita quando as plântulas tinham cerca de 3-3,5 cm de altura, consistiu na adição de 8 mL de meio B de King líquido em que as bactérias cresciam há 72 horas. A testemunha sem inoculação recebeu o mesmo volume de meio de cultura esterilizado. A inoculação foi repetida quatro meses depois. Avaliou-se a altura das plantas no dia da primeira inoculação e 33, 65, 100, 163 e 237 dias depois. Colheram-se as plantas 260 dias após a primeira inoculação, sendo determinada sua massa de matéria seca. Colheu-se primeiramente a parte aérea das plantas; para a colheita das raízes, um jato com grande volume de água foi aplicado sobre o substrato onde cresciam, de maneira a retirar o substrato emanter as raízes na forma mais preservada possível. Adotou-se esse procedimento em todos os experimentos aqui descritos.

Em outro experimento, plântulas de limoeiro 'Cravo' e de tangerineira 'Cleópatra', outro porta-enxerto bastante utilizado, receberam isolados apenas de *Pseudomonas* fluorescentes. As plantas de limoeiro 'Cravo' receberam sete isolados, três dos quais também foram inoculados em tangerineira 'Cleópatra'. Neste experimento, as sementes foram colocadas para germinar em caixas com areia esterilizada. Dois meses depois, quando tinham cerca de 8 cm de altura, foram transferidas para vasos com 0,5 kg de areia esterilizada, com cinco repetições por tratamento. O preparo do inóculo e a inoculação propriamente dita foram feitos de maneira semelhante à já descrita para o experimento anterior. Semanalmente, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva para fornecer a cada uma as seguintes quantidades de nutrientes, em mg: N, 8,68; P, 0,80; K, 5,80; Ca, 6,93; Mg, 0,91 e S, 0,924. Adicionou-se também uma solução de micronutrientes, com exceção do Fe, para fornecer a cada planta as seguintes quantidades de nutrientes, em mg: B, 0,01; Cl, 1,81; Cu, 0,002; Mn, 0,03; Mo, 0,04 e Zn, 0,008. Quando tinham cinco meses de idade, as plantas foram retiradas dos vasos e tiveram sua matéria seca determinada.

Num terceiro experimento, realizou-se um teste semelhante ao anterior, com relação às condições de germinação das sementes, inoculação das bactérias e manutenção das plantas em casa de vegetação, com limoeiro 'Volcameriano' (*C. volkameriana*), com cinco repetições de cada tratamento. A inoculação, logo em seguida ao transplante para os vasos, foi feita quando as plântulas tinham cerca de 4 cm de altura, sendo

colhidas 60 dias depois do transplante, para a determinação da massa de matéria seca. Foram inoculados dez isolados, todos de *Pseudomonas* fluorescentes.

Para todos os experimentos em casa de vegetação, as análises de variância foram pelo teste F e as comparações de médias, pelo teste unilateral de Dunnett. No experimento com avaliação de altura, as médias foram comparadas somente em cada época de medição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem de bactérias na rizosfera de plantas cítricas

Dentre as bactérias fluorescentes, houve diferença estatística quanto à origem, isto é, entre plantas amostradas em telado – um ambiente protegido e com substrato orgânico – e no campo, somente para a tangerineira 'Cleópatra', cujas plantas providas do telado tiveram números maiores de bactérias do que as amostras do campo (Quadro 1). Há muitas diferenças entre uma e outra condição: em vasos, o volume de substrato disponível para exploração pelas raízes é bem menor, aumentando a relação R/S, isto é, a proporção entre o solo rizosférico e o não-rizosférico, com maior oferta de matéria orgânica e nutrientes proporcionada pela rizosfera (Cardoso & Freitas, 1992).

Além disso, a diversidade dos microrganismos nos vasos pode ser menor que no campo – pelo substrato, mais homogêneo que o solo, com menor variabilidade na oferta de compostos nutritivos –, ensejando, ao mesmo tempo, que bactérias fluorescentes nos citropotes tenham menor gama de competidores.

Recentemente (Freitas et al., 2003), foi relatado que a fertilidade do substrato pode influenciar a atividade de promoção do crescimento de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Caminhos de sobrevivência menos complexos devem ser suficientes para tornar as bactérias fluorescentes colonizadoras de sucesso. É certo que alguns processos de tratamento do solo podem favorecer alguns grupos microbianos, inclusive as fluorescentes do gênero *Pseudomonas* (Gamliel & Stapleton, 1993).

A diferença quanto à condição ocorreu somente na rizosfera das mudas de tangerineira 'Cleópatra', porque na rizosfera do limoeiro 'Cravo' não se observaram diferenças entre a contagem de bactérias nos citropotes e no campo. Isso indica, talvez, que a tangerineira 'Cleópatra', ainda na fase juvenil em que se encontrava no citropote, tenha produzido algum composto benéfico às bactérias fluorescentes, composto esse ausente – ou presente em quantidades muito menores – quando a planta estava crescendo no campo. O limoeiro 'Cravo' não apresentou essa característica. Assim, é possível que os dois fatores – o favorecimento das bactérias pela adição de substratos orgânicos ao solo e algum fator exsudado pela tangerineira 'Cleópatra' – tenham contribuído para essas diferenças.

É interessante notar que variação de comportamento de isolados bacterianos, tanto de *Bacillus* quanto de *Pseudomonas*, foi observada por Chanway et al. (2000). Isolados desses dois gêneros comportaram-se diferentemente, quanto à promoção do crescimento de abeto, dependendo do local em que foram utilizados. Os autores não encontraram correlação entre o número de bactérias recuperadas da rizosfera das plântulas de abeto e a promoção do crescimento, mas essa recuperação foi feita quase um ano e meio após a inoculação, tendo sido, em alguns locais, as populações bacterianas muito baixas.

Quadro 1. Quantificação de bactérias fluorescentes e não-fluorescentes na rizosfera de dois porta-enxertos de citros, em condições de campo e de ambiente protegido

Condição	Porta-enxerto		Total
	Tangerineira 'Cleópatra'	Limoeiro 'Cravo'	
Bactérias fluorescentes (ufcs g ⁻¹ de raízes)			
Telado	344,37 x 10 ³ aA ⁽¹⁾	21,77 x 10 ³ aB	183,07 x 10 ³
Campo	0,90 x 10 ³ bA	8,71 x 10 ³ aA	4,81 x 10 ³
Total	172,64 x 10 ³	15,24 x 10 ³	
Bactérias não-fluorescentes (ufcs g ⁻¹ de raízes)			
Telado	3,00 x 10 ⁶ aA	0,22 x 10 ⁶ bB	1,61 x 10 ⁶
Campo	1,00 x 10 ⁶ bA	0,77 x 10 ⁶ aA	0,89 x 10 ⁶
Total	2,00 x 10 ⁶	0,50 x 10 ⁶	

⁽¹⁾ Dentro de cada grupo bacteriano, médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si (Tukey 1 %).

Neste trabalho, os números de bactérias fluorescentes foram bem maiores na rizosfera das plântulas que cresciam em citropotes que na das plantas adultas, amostradas no campo. Este artigo e o de Chanway et al. (2000), embora apresentem características muito diversas, têm em comum a variação nas populações de bactérias fluorescentes, dependendo do local e da condição de amostragem.

O tamanho da população de determinado isolado bacteriano deve mesmo variar ao longo do tempo de crescimento das plantas: Jjemba & Alexander (1999), avaliando periodicamente as populações de 19 espécies bacterianas introduzidas na rizosfera de soja cultivada em solo não-estéril, observaram diferenças marcantes nos tamanhos finais de suas populações e concluíram que a habilidade das bactérias em sobreviver em grandes números no solo constitui grande determinante do seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera.

Quanto às bactérias não-fluorescentes, ocorreram situações diversificadas: na rizosfera de tangerineira 'Cleópatra', houve maior número de organismos nas plantas retiradas dos citropotes que nas amostradas no campo. O inverso ocorreu na rizosfera de limoeiro 'Cravo', com maior número de bactérias não-fluorescentes no campo. Como bactérias não-fluorescentes incluem, é claro, representantes de grupos muito mais diversificados, é razoável supor-se que esse efeito de favorecimento seja resultado de uma exsudação quantitativamente maior na rizosfera de limoeiro 'Cravo', na condição de campo. Se as bactérias fluorescentes não foram favorecidas por esse maior volume de exsudatos é porque deveriam estar se desenvolvendo em boas condições, ou em condições em que a quantidade de alimentos não era o fator limitante.

Todavia, conforme já comentado, nos citropotes, as bactérias fluorescentes foram também marcadamente favorecidas pelas plantas de tangerineira 'Cleópatra'. Esse favorecimento foi observado similarmente para as bactérias não-fluorescentes. Parece haver a produção de alguma substância benéfica pela tangerineira 'Cleópatra' na fase de crescimento em citropotes. O limoeiro 'Cravo' inverteu essa tendência, propiciando o crescimento de maior número de bactérias não-fluorescentes no campo em relação aos citropotes, talvez como resultado de um maior volume de exsudatos radiculares.

Teste de promoção do crescimento por rizobactérias

Observou-se que as bactérias inoculadas não tiveram efeito sobre a altura das plantas, mas, sim, sobre a sua matéria seca (Quadros 2 e 3). O efeito propiciado, nesse caso, foi sempre sobre a massa das raízes e nunca sobre a da parte aérea. Quatro isolados de *Pseudomonas* – 40 % do total – um de

Bacillus – 8 % do total – e um do grupo denominado outras bactérias rizosféricas – 14 % do total – tiveram esse efeito benéfico sobre as plantas em que foram inoculadas. É uma proporção um pouco mais baixa do que a observada por Freitas et al. (2003), que verificaram que até 80 % das bactérias do grupo fluorescente inoculadas foram benéficas às plantas de alface, mas, de qualquer maneira, houve maior número de isolados desse grupo bacteriano entre os benéficos.

Não há muitos estudos sobre a interação de plantas perenes e RPCPs, mas há relatos, por Chanway et al. (2000), de que bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* tiveram algum efeito tanto sobre a matéria seca quanto sobre a altura de

Quadro 2. Altura média, em seis épocas, de plantas de limoeiro 'Cravo' que receberam a inoculação de diferentes bactérias

Tratamento	Amostragem (dia)					
	1	33	65	100	163	237
	cm					
Testemunha	3,39 ⁽¹⁾	4,30	4,70	6,36	7,45	8,99
	<i>Pseudomonas</i> spp.					
Ps 45A	3,77	4,62	5,61	7,68	9,52	11,52
Ps 45B	3,54	4,36	5,49	7,30	8,64	10,57
Ps 55	3,34	4,25	5,06	6,32	7,60	8,82
Ps 60A	3,54	4,32	5,07	7,21	8,87	10,66
Ps 70	3,49	4,46	5,14	6,82	7,55	9,22
Ps 80	3,76	4,76	5,61	7,35	8,93	10,56
Ps 85	3,74	4,07	5,37	6,19	8,25	9,54
Ps 88	2,94	4,47	5,46	7,21	8,36	10,03
Ps 91	3,59	4,31	5,31	7,52	9,25	10,82
Ps 92	3,31	4,37	5,01	7,21	8,27	9,44
	<i>Bacillus</i> spp.					
Bc 41A	3,22	4,05	5,01	7,33	8,33	9,79
Bc 41B	3,64	4,21	4,97	6,32	8,06	9,06
Bc 55	3,86	4,05	4,59	6,98	8,02	9,23
Bc 60	3,59	3,84	4,12	5,60	6,89	8,16
Bc 70	2,98	3,95	4,48	6,72	7,70	8,96
Bc 80	3,13	3,74	4,38	6,06	6,92	7,94
Bc 81	3,04	4,14	4,62	6,76	7,77	9,14
Bc 85A	3,25	3,67	4,24	5,79	6,77	8,63
Bc 85B	3,02	3,56	4,11	6,18	6,97	8,43
Bc 88	3,06	3,82	4,22	6,45	7,54	8,91
Bc 90	2,94	4,11	4,84	7,17	8,22	9,64
Bc 91	3,16	4,64	4,99	7,39	8,25	9,65
Bc 92	3,16	4,64	4,99	7,39	8,25	9,65
	Outras bactérias rizosféricas					
Rz 41	3,60	4,54	5,23	6,76	8,23	9,82
Rz 60	3,42	4,07	4,37	6,42	7,56	9,54
Rz 70	3,11	4,00	4,54	5,96	7,08	8,22
Rz 80	3,32	3,80	4,47	6,00	7,05	8,15
Rz 81	2,76	4,34	4,96	6,59	8,08	9,78
Rz 88	3,17	4,48	4,93	6,45	7,71	9,16
Rz 90	3,29	4,32	4,73	7,04	7,75	9,34

⁽¹⁾ Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (teste unilateral de Dunnett 5 %).

Quadro 3. Matéria seca de plantas de limoeiro 'Cravo' colhidas 260 dias após a inoculação com diferentes isolados bacterianos

Tratamento	Parte aérea		Total
	Parte aérea	Raiz	
	g		
Testemunha	0,51	0,38	0,89
	<i>Pseudomonas</i> spp		
Ps 45A	0,74	0,78**	1,55*
Ps 45B	0,64	0,78**	1,41
Ps 55	0,46	0,50	0,96
Ps 60A	0,69	0,76*	1,44
Ps 70	0,49	0,60	1,10
Ps 80	0,59	0,68	1,26
Ps 85	0,52	0,60	1,11
Ps 88	0,62	0,69	1,30
Ps 91	0,66	0,69*	1,35
Ps 92	0,52	0,56	1,08
	<i>Bacillus</i> spp.		
Bc 41A	0,66	0,62	1,28
Bc 41B	0,51	0,64	1,15
Bc 55	0,55	0,68	1,22
Bc 60	0,39	0,48	0,88
Bc 70	0,57	0,69*	1,26
Bc 80	0,43	0,45	0,88
Bc 81	0,57	0,57	1,14
Bc 85A	0,45	0,51	0,96
Bc 85B	0,50	0,59	1,08
Bc 88	0,49	0,51	0,99
Bc 90	0,37	0,54	0,91
Bc 91	0,54	0,66	1,20
Bc 92	0,72	0,63	1,05
	Outras bactérias rizosféricas		
Rz 41	0,55	0,54	1,09
Rz 60	0,63	0,61	1,24
Rz 70	0,42	0,51	0,94
Rz 80	0,36	0,45	0,81
Rz 81	0,63	0,65	1,28
Rz 88	0,51	0,56	1,06
Rz 90	0,56	0,76*	1,32

* e ** Médias diferem da testemunha a 5 (*) e 1 (**) % pelo teste unilateral de Dunnett.

plantas de abeto; todavia, os autores não apresentaram os dados dessa última variável, provavelmente pela grande variabilidade dos resultados. Já Freitas (1989) detectou aumentos significativos da altura e da massa de matéria seca em plântulas de cafeeiro que receberam isolados de *Pseudomonas* fluorescentes. Nesse caso, a autora não detectou grande variabilidade dos dados referentes à matéria seca e à altura, mas, sim, dos relativos aos teores de micronutrientes na parte aérea das plântulas.

No quadro 4, estão os resultados do experimento em que limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Cleópatra' receberam alguns isolados de *Pseudomonas*. Nesse caso, o isolado Ps 70, que já havia sido inoculado em limoeiro 'Cravo' no experimento anterior, sem promover o crescimento da planta, resultou em aumento da matéria seca da parte aérea desse porta-enxerto. Já os isolados Ps 45A, Ps 45B e Ps 60A, que haviam resultado em efeito benéfico no experimento anterior (Quadro 3), não exerceram benefício nas condições do segundo experimento. Nenhum outro isolado apresentou efeito.

No quadro 5, são observados, novamente, efeitos benéficos de três isolados de *Pseudomonas*, mas agora sobre a parte aérea das plantas de limoeiro 'Volcameriano'. Dentre esses isolados, o Ps 91 já havia sido benéfico para as raízes de limoeiro 'Cravo', mas não sobre a sua parte aérea.

Mais do que os resultados específicos, que podem oferecer informações limitadas, o que se observa aqui, de uma análise geral dos resultados apresentados, é uma grande instabilidade no comportamento – quanto à capacidade de promoção do crescimento – dos isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente. Essa instabilidade já é conhecida para algumas RPCPs (Hebbar et al., 1992a,b), um dos motivos pelos quais o pleno uso de inoculantes tem demorado tanto.

Quadro 4. Matéria seca, em gramas, de plantas de limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Cleópatra', colhidas 150 dias após a inoculação com diferentes bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*

Tratamento	Limoeiro 'Cravo'		Tangerina 'Cleópatra'	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
	g			
Testemunha	0,69	0,44	0,52	0,29
Ps 45	0,53	0,30	0,62	0,40
Ps 45B	0,49	0,32	0,52	0,44
Ps 60A	0,58	0,33	0,66	0,43
Ps 70	0,47*	0,30	-	-
Ps 80	0,55	0,40	-	-
Ps 85	0,75	0,51	-	-
Ps 88	0,62	0,38	-	-

* Valores estatisticamente diferentes da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett (5 %).

Quadro 5. Matéria seca de plantas de limoeiro 'Volcameriano' colhidas 60 dias após a inoculação com diferentes bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*

Tratamento	Parte aérea	Raiz	Total
	g		
Testemunha	0,66	0,55	1,21
Ps 45A	0,89	0,67	1,56
Ps 45B	0,81	0,68	1,49
Ps 60A	0,56	0,34	0,90
Ps 70	0,66	0,61	1,27
Ps 80	0,79	0,71	1,50
Ps 85	1,15*	0,91	2,06
Ps 88	1,16*	0,74	1,90
Ps 91	0,22*	0,15	0,37
Ps 92	0,94	0,65	1,59

* Valores estatisticamente diferentes da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett (5 %).

Considerando as condições de cada experimento, verifica-se que, no primeiro deles, o substrato foi à base de casca de *Pinus*, enquanto, nos dois outros, o substrato foi areia esterilizada, ainda que tenha sido feita irrigação com solução nutritiva. No terceiro, a planta foi limoeiro 'Volcameriano', diferente dos dois anteriores, mas o limoeiro 'Cravo' foi comum ao primeiro e ao segundo experimento, tendo sido nesse último todos os isolados inoculados comuns aos dois experimentos. Por que não foi repetido seu desempenho nos dois experimentos, já que a diferença entre ambos foi apenas quanto ao substrato? Ainda que o último não tenha sido tratado e a areia tenha passado por autoclavagem, a condição de esterilidade foi rompida no momento em que foi colocada nos vasos. A exposição da areia ao ar e a irrigação com água não esterilizada rapidamente introduziram microrganismos no ambiente do vaso. Por mais que se argumente com a variação entre a areia e o Plantmax, fica a dúvida quanto à extrema sensibilidade das bactérias do grupo às condições de crescimento.

Esse aspecto já foi observado por Berggren et al. (2001), que investigaram as interações entre *Pseudomonas* fluorescentes e estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, bactéria que estabelece relação simbiótica com plantas de ervilha (*Pisum sativum*), fixando N₂ atmosférico. Encontraram diversos isolados de *Pseudomonas*, inibidores do processo de fixação simbiótica, cujo efeito era alterado pelos valores de pH do meio. Nesse caso, ocorreu variabilidade quanto à atuação de *Pseudomonas* sobre outra bactéria, possivelmente pelo efeito diferenciado do pH sobre o metabolismo que resultava na produção da substância inibidora. No entanto, Chanway et al. (2000) observaram forte interação dos isolados de *Pseudomonas* com o local

em que cresciam, na rizosfera de abeto no campo. Os autores comentaram mesmo sobre a grande "variabilidade interna" dos tratamentos. Trabalhando com isolados de *Pseudomonas* solubilizadores de fosfatos, Rodriguez & Fraga (1999) concluíram que uma eventual manipulação genética desse grupo deveria ser dirigida para a maior estabilidade do caráter manipulado. Numa situação semelhante à deste experimento, Freitas et al. (2003), utilizando isolados desse mesmo grupo bacteriano, também relataram instabilidade no comportamento de alguns deles, embora outros tenham mantido suas características em situações diversificadas. No presente trabalho, os experimentos em casa de vegetação foram desenvolvidos em condições diferentes entre si, principalmente quando se considera que o substrato do primeiro foi de cascas de *Pinus* e dos outros, areia. As situações são diferentes, o que reforça a discussão da limitação do seu uso.

Como se vê, o grupo fluorescente de *Pseudomonas* parece caracterizar-se por grande instabilidade de comportamento em diversas atividades. Assim, não é de surpreender que, neste experimento, o mesmo fenômeno tenha ocorrido. Será, realmente, tão grande a susceptibilidade das bactérias ao seu meio? Mais que isso: será sua forma de atuação tão específica, tão restrita, que uma simples mudança das condições ambientes basta para alterar sua capacidade de promover o crescimento vegetal? Se essa capacidade advier de um passo do metabolismo que resulte na produção de uma única substância, justamente a responsável pelo benefício à planta, a resposta deve ser sim. Uma opção para contornar esse problema seria o uso de misturas de isolados benéficos, com diferentes modos de ação.

É cada vez mais premente o conhecimento do modo de ação das RPCPs. Uma vez conhecido, será possível conhecer também as condições que o alteram e, especificamente, as que o favorecem. É desse conjunto de informações que se poderá finalmente estabelecer a melhor forma de utilização das RPCPs, seja pela inoculação de isolados comprovadamente benéficos, seja pelo manejo das condições do meio para favorecer sua atuação.

Ainda que se tenha observado instabilidade, dos 10 isolados de *Pseudomonas* utilizados, sete – 70 % do total – propiciaram algum benefício às plantas, sobre a matéria seca das raízes ou da parte aérea, em um ou outro porta-enxerto. Quanto aos outros grupos bacterianos, um dos 13 isolados de *Bacillus* – 7 % do total – e um dos sete de outras bactérias rizosféricas – 14 % do total – foram benéficos. Semelhantemente ao relatado por Kloepper (1993) e, no Brasil, recentemente, por Freitas et al. (2003), bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* freqüentemente têm atividade como promotoras do crescimento de plantas, o que pode ser um aspecto importante a guiar processos de seleção de RPCPs.

CONCLUSÕES

1. Isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* e outras bactérias rizosféricas podem agir como promotores do crescimento de plantas cítricas.

2. *Pseudomonas* fluorescentes têm seu desenvolvimento influenciado por fatores como o tipo de substrato e o ambiente em que se desenvolvem, bem como pela rizosfera em que estão estabelecidas.

3. *Pseudomonas* fluorescentes têm comportamento instável quanto à promoção do crescimento de plantas cítricas.

LITERATURA CITADA

- AMARO, A.A.; VICENTE, M.C.M. & BAPTISTELLA, C.S.L. Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. Laranja, 22:1-37, 2001.
- BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J. & AUDRAN, J.C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol. Letters, 186:91-95, 2000.
- BERGGREN, J.W.; van VUURDE, L. & MARTENSSON, A.M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae. Appl. Soil Ecol., 17:97-105, 2001.
- BORGES, R.S.; ALMEIDA, F.J.; SCARANARI, C.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. & AGUILAR-VILDOSO, C.I. Programa IAC/EMBRAPA/CNPq de incentivo à produção e difusão de mudas de citros isentas da clorose variegada dos citros. Laranja, 21:205-224, 2000.
- CARDOSO, E.J.B.N. & FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P., eds. Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.41-57. 1992.
- CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de FMVA em porta-enxertos de citros. R. Bras. Ci. Solo, 10:25-30, 1986.
- CATTELAN, A.J. Aumento no rendimento de grãos de soja e trigo, a campo, através da inoculação com bactérias promotoras do crescimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., Londrina, 2001. Programa e Resumos. Londrina, 2001. p.61.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F.G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. For. Ecol. Manag., 133:81-88, 2000.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N. & PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum* Physiol. Molec. Plant Pathol., 56:13-23, 2000.
- FNP. Agriannual 2001: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, OESP Gráfica, 2001. 545p.
- FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) Sum. Phytopathol., 23:36-41, 1997.
- FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). Summa Phytopathol., 17:105-112, 1991.
- FREITAS, S.S.; MELLO, A.M.T. & DONZELI, V.P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. R. Bras. Ci. Solo, 27:61-70, 2003.
- FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. R. Bras. Ci. Solo, 13:31-34, 1989.
- GAMLIEL, A. & STAPLETON, J.J. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. Plant Disease, 77:886-891, 1993.
- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G. & DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification. Soil Biol Biochem., 24:979-987, 1992a
- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G.; MERRIN, J. & DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. Soil Biol. Biochem., 24:989-997, 1992b.
- JJEMBA, P.K. & ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. Soil Biol. Biochem., 31:623-632, 1999.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clinical Med., 44:301-307, 1954.
- KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F.B., ed. Soil microbial ecology. New York, Marcel Dekker, 1993. p.255-274.
- LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. Fitopatol. Bras., 26:597-600, 2001.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases Crop Protec., 20:1-11, 2001.
- RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv., 17:319-339, 1999.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O. & CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. R. Bras. Ci. Solo, 19:205-211, 1995.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol., 15:183-190, 2000.