

ARTIGOS

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

Élida Barbosa Corrêa¹; Wagner Bettiol² e John Clifford Sutton³

¹Faculdade de Ciências Agrárias, FCA/UNESP, Rod. Alcides Soares Km 3, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil; ²Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil; ³University of Guelph, Department of Environmental Biology, Guelph, ON N1G 2W1, Canadá; ^{4,2}Bolsistas do CNPq.

Autor para correspondência: Élida B. Corrêa (elidabcorrea@yahoo.com.br)

Data de chegada: 06/04/2010. Aceito para publicação em: 06/12/2010.

1687

RESUMO

Corrêa, E.B.; Bettiol, W.; Sutton, J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.275-281, 2010.

Podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* são um importante problema em cultivos hidropônicos. Sintomas de subdesenvolvimento são observados nas plantas parasitadas pelo patógeno, sendo muitas vezes não diagnosticados pelo produtor. O objetivo do trabalho foi avaliar o controle biológico da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e a promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03, reconhecidos agentes de controle biológico de doenças de

plantas. A inoculação das plantas com *P. aphanidermatum* ocasionou o subdesenvolvimento, sendo essa diminuição de 20%. A adição dos agentes de biocontrole na solução nutritiva teve um efeito positivo no aumento da massa (6% a 13%), no número de folhas (4% a 7%) e no teor de clorofila (3%) das plantas de alface. Entretanto, maiores estudos devem ser realizados para melhorar a capacidade de controle da doença e de promoção de crescimento pelos agentes de biocontrole estudados no cultivo de alface hidropônica.

Palavras-chave adicionais: *Lactuca sativa*, hidroponia, biocontrole.

ABSTRACT

Corrêa, E.B.; Bettiol, W.; Sutton, J.C. Biocontrol of root rot (*Pythium aphanidermatum*) and growth promotion with *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03 in hydroponic lettuce. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.275-281, 2010.

Root rot caused by *Pythium* species is a major problem in hydroponically-grown crops. Symptoms of canopy stunting are noticed in plants colonized by the pathogen and many times they are not diagnosed by the grower. The aim of this work was to evaluate biological control and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 and *Bacillus subtilis* GB03, known biocontrol agents of plant diseases. Inoculation of plants with *P.*

aphanidermatum decreased lettuce mass by 20%. The introduction of the biocontrol agents to the nutrient solution was beneficial for plant growth increasing the plant mass (6% to 13%), the number of leaves (4% to 7%) and the chlorophyll content (3%) of the lettuce plants. Further studies are needed, however, to improve the effectiveness of disease control and growth promotion by the biological agents in hydroponic lettuce.

Keywords: *Lactuca sativa*, hydroponic, biocontrol.

O cultivo protegido de alface hidropônica é uma atividade que cresce devido à antecipação do ciclo da cultura, à padronização do produto colhido, o maior controle e planejamento da produção e à elevada aceitabilidade do mercado consumidor (5, 6, 26). Apesar das vantagens do cultivo hidropônico, esse ambiente é favorável à ocorrência de podridões radiculares, principalmente as causadas por *Pythium* spp. Fatores como a elevada densidade de plantas, a circulação da solução nutritiva, a adaptação do patógeno às condições aquáticas e a baixa diversidade microbiana são responsáveis pela elevada severidade de podridões radiculares em hidroponia (14, 22, 23, 26).

A ausência de variedades comerciais resistentes às podridões

radiculares causadas por *Pythium* spp. e de fungicidas registrados para a utilização em sistemas hidropônicos faz com que produtores utilizem métodos de controle físico, como a desinfestação da solução nutritiva com radiação ultravioleta, filtração e elevação da temperatura para o controle da doença (2). Entretanto, esses métodos não são efetivos por não afetarem a população do patógeno presente na zona radicular (22). A adição de microrganismos antagônicos às espécies de *Pythium* em sistemas hidropônicos é uma medida que se mostra eficiente no controle dos danos causados pela doença (1, 2, 9, 16, 18, 23). Além de controlar a doença, microrganismos podem promover o crescimento de plantas, aumentando a receita do produtor (2, 16, 23).

Espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* são reconhecidas como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas em cultivos protegidos (15). *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard & Sauvageau 1894) Bergey *et. al.*, 1930, isolado 63-28, é um dos melhores isolados bacterianos avaliados para o controle biológico e promoção de crescimento de plantas no Canadá (15). A sua eficiência foi demonstrada no controle da podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. e na promoção de crescimento de pimentão, crisântemo e pepino cultivados em hidroponia (10, 12, 13). *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn GB03, reconhecido agente de controle biológico, é comercializado no bioproduto Companion[®], para o controle de doenças de parte aérea e radiculares em cultivos convencionais, hidropônicos e orgânicos (4, 7).

O objetivo do trabalho foi avaliar o controle biológico da podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e o efeito de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 no crescimento de plantas de alface hidropônica.

MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do controle biológico da podridão radicular e da promoção de crescimento por *P. chlororaphis* 63-28 (Turf Science Laboratories Inc., National City, CA, EUA) e *B. subtilis* GB03 (Companion[®], Growth Products, White Plains, NY, EUA) em alface hidropônica foi realizada em três experimentos (I, II e III) na Universidade de Guelph, Canadá. No I, *P. chlororaphis* 63-28 foi aplicada uma (1x) ou duas vezes (2x) na solução nutritiva das plantas inoculadas ou não com o patógeno; no II, *B. subtilis* GB03 (Companion[®]) foi aplicado uma (1x) ou duas (2x) vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas com o patógeno e uma (1x) vez nas plantas não inoculadas com o patógeno; e no III, *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 foram aplicados duas (2x) vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas ou não com o patógeno. O período de aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 foi sete dias antes da inoculação com o patógeno (1x) e no dia da inoculação com *P. aphanidermatum* (2x).

Preparo das mudas de alface e da solução nutritiva

As sementes de alface romana cv. Green Towers MI (Stokes Seeds LTD., Welland, ON, Canadá) foram semeadas em lâ de rocha (2,5 cm x 2,5 cm x 4,0 cm, Grodan, Roermond, Holanda) e irrigadas com água deionizada durante 11 dias em câmara de crescimento com o fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes (115 W Branco Frio; GTE, Sylvania Ltd, Canadá), suplementada com lâmpadas incandescentes a 26±1°C. Após esse período, as plântulas foram transferidas para cestas plásticas (Homegrown Hydroponics, Breslau, ON) com argila expandida (LECA) utilizada para dar suporte às plantas e irrigadas com solução nutritiva com a condutividade elétrica (CE) de 1,0 mS cm⁻¹ durante 15 dias. Plantas com 26 dias de desenvolvimento foram acondicionadas em unidades hidropônicas compostas por recipientes de polietileno branco, contendo 475 mL de solução nutritiva (CE=2,0 mS cm⁻¹). A preparação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se 1,15 g do fertilizante solúvel 7-11-27 (NPK + micronutrientes: Plant Products Ltd., Brampton, ON, Canadá) e 0,775 g de Ca(NO₃)₂ por litro de água deionizada, sendo o pH da solução nutritiva ajustado para 5,8 (8). A CE e o pH da solução nutritiva foram mensurados com um medidor de pH portátil

(Accumet model AP61, Fisher Scientific, Toronto, Canadá). Para se excluir a luz das unidades hidropônicas, a tampa foi coberta com plástico dupla face (preto-branco), com o lado branco na parte interior. A solução nutritiva, em cada unidade, foi continuamente aerada por bombas de aquário com tubos de plástico (2 mm de diâmetro interno) e reposta quando necessário.

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

A multiplicação de *P. chlororaphis* 63-28 foi realizada em meio de cultura líquido TSB (Tryptic Soy Broth) por um período de 48 h em agitação constante a 150 rpm a 22±1°C, e posterior centrifugação por 15 min a 2000 g. As células recuperadas foram lavadas duas vezes utilizando-se tampão 0,1 M MgSO₄ por meio da centrifugação a 2000 g por 10 min de acordo com metodologia adaptada de Chatterton *et al.* (1).

A infestação da solução nutritiva foi realizada adicionando-se *P. chlororaphis* 63-28 na concentração final de 10⁷ UFC mL⁻¹ e Companion[®] (Growth Products, White Plains, NY, EUA) na concentração final de 5x10⁴ UFC mL⁻¹ de *B. subtilis* GB03 para a primeira aplicação (1x) (260 mL de Companion[®] por 1000 L de solução nutritiva) e de 3x10⁴ UFC mL⁻¹ (156 mL de Companion[®] por 1000 L de solução nutritiva), para a segunda aplicação (2x), sendo estas doses recomendadas pelo fabricante para o uso em hidroponia.

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

Zoósporos do isolado de *P. aphanidermatum* P6 foram produzidos por meio da técnica adaptada de Rahimian & Banihashemi (19). O patógeno foi cultivado em meio de cultura V8 (100 mL de suco V8, 2 g de CaCO₃, 16 g de Ágar em 900 mL de água deionizada) em placas de Petri por 48 h na temperatura de 27 °C. Após esse período, metade do conteúdo do meio de cultura com o crescimento do patógeno foi transferido para outra placa, onde nestas placas foram adicionados aproximadamente 20 mL de água deionizada esterilizada. As culturas foram incubadas novamente por 72 h, quando houve nova troca de água. Após a segunda troca de água, as culturas foram incubadas a 23±1°C, e após aproximadamente 4 h os zoósporos foram liberados. A densidade de zoósporos foi estimada após a vibração de 5 mL das amostras em microtubos em Vortex (Fisher Scientific, Toronto, Ontario, Canadá) por 30 seg. Após os zoósporos perderem a sua mobilidade, a sua concentração na solução foi estimada com o auxílio de um hemacitômetro, sendo a suspensão posteriormente ajustada para 1x10⁴ zoósporos mL⁻¹.

Para a inoculação, cada planta foi cuidadosamente posicionada em um Becker com o sistema radicular totalmente imerso na suspensão de zoósporos por 30 min. A suspensão de zoósporos foi obtida utilizando-se solução nutritiva com a metade da sua concentração. Os sistemas radiculares das plantas dos tratamentos controle, sem a inoculação com o patógeno, foram imersos em solução nutritiva com a metade da sua concentração. Após a inoculação das plantas a temperatura da câmara de crescimento foi ajustada de 26±1 °C para 30±1 °C, e a aeração das plantas foi realizada por um período de 8 h por dia, sendo essas mudanças realizadas para aumentar à suscetibilidade das plantas à podridão radicular (22).

Avaliação dos experimentos

A avaliação da incidência do patógeno foi realizada por meio do plaqueamento de amostras de raízes retiradas ao acaso no final do experimento. Cinco segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, de cada planta, foram plaqueados em meio P5AR (20 g de Corn Meal Ágar em 1000 mL de água deionizada, acrescido de 250 mg L⁻¹ de ampicilina e 10 mg L⁻¹ de rifampicina após a autoclavagem) e incubados a 27 °C por 72 h. A incidência do patógeno nas raízes foi avaliada por meio da observação de estruturas de reprodução do patógeno ao microscópio ótico.

As análises não destrutivas das plantas foram realizadas por meio da avaliação do crescimento foliar, do teor de clorofila foliar e da contagem do número de folhas expandidas. As análises destrutivas foram realizadas por meio da pesagem da massa das plantas. A avaliação da expansão da área foliar foi realizada após a inoculação das plantas, marcando-se uma folha jovem expandida, disposta na parte central da planta, por repetição de cada tratamento e realizando-se o desenho dessa mesma folha em transparência. No final do experimento realizou-se a conversão do peso do desenho da folha em área foliar. O cálculo da área abaixo da curva de crescimento das folhas foi realizado por meio da fórmula descrita por Shaner & Finney (20). O conteúdo de clorofila nas folhas foi avaliado no final do experimento por meio do equipamento Chlorophyll Meter Minolta SPAD-502 determinando-se a média do pigmento em quatro quadrantes por folha, sendo avaliadas cinco folhas por repetição. Nas análises destrutivas, o sistema aéreo foi separado do sistema radicular e imediatamente pesado. Todas as raízes do exterior da lâ de rocha foram removidas, secas e pesadas para determinar a massa fresca. Para a medida de massa seca, os sistemas aéreos e radiculares foram secos a 80 °C por 48 h em estufa de secagem, onde foram obtidos os valores da massa de matéria seca constante.

Análises estatísticas

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pythium aphanidermatum causou subdesenvolvimento das plantas de alface hidropônica (Tabelas 1 e 2), incidindo sobre 100% das raízes nos tratamentos em que foi inoculado. Além do sintoma clássico de podridão radicular, plantas parasitadas por espécies de *Pythium* podem apresentar murcha, diminuição da produção, clorose, escurecimento vascular e subdesenvolvimento (13, 22, 25), como o observado no presente trabalho. Subdesenvolvimento em alface hidropônica parasitada por *Pythium* spp. também foi verificado por Corrêa & Bettiol (2) e Utkhede *et al.* (21). O subdesenvolvimento é expresso nas plantas onde o parasitismo de *Pythium* encontra-se na fase biotrófica, sem a exibição de sintomas de podridão e murcha, sendo também denominada de infecção subclínica (21). Os fatores que ocasionam a transição da fase biotrófica para a necrotrófica ainda não estão esclarecidos. Contudo, estudos apontam para a existência de um elicitor denominado PaNie (*Pythium aphanidermatum* necrosis - inducing elicitor), responsável pelo desencadeamento do escurecimento radicular (24). Devido à elevada densidade de plantas utilizadas em cultivos hidropônicos e

Tabela 1. Efeito da introdução de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 na solução nutritiva de plantas de alface, antes e/ou no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*, sobre a massa das plantas, aos 15 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

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

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

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

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

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

a não exibição de sintomas de murcha e podridão radicular, muitas vezes o produtor não detecta a doença no cultivo, resultando em perdas de massa até que ocorra e expressão da doença necrotroficamente. Diminuições na ordem de 20% foram verificadas

na massa fresca e seca das plantas inoculadas com o patógeno (Tabelas 1 e 2), sendo essa diminuição relacionada diretamente com a diminuição na receita do produtor de alface hidropônica que comercializa o seu produto por massa.

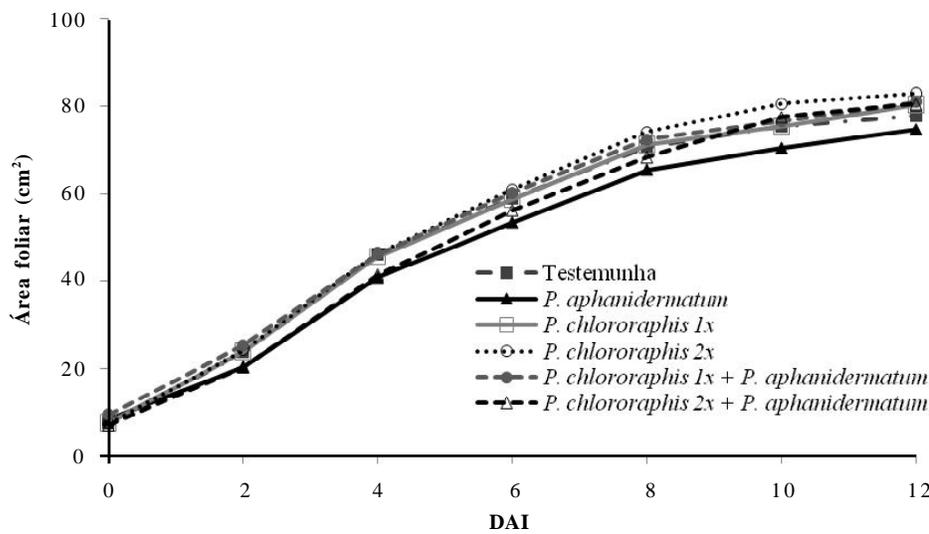


Figura 1. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a aplicação na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28, sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

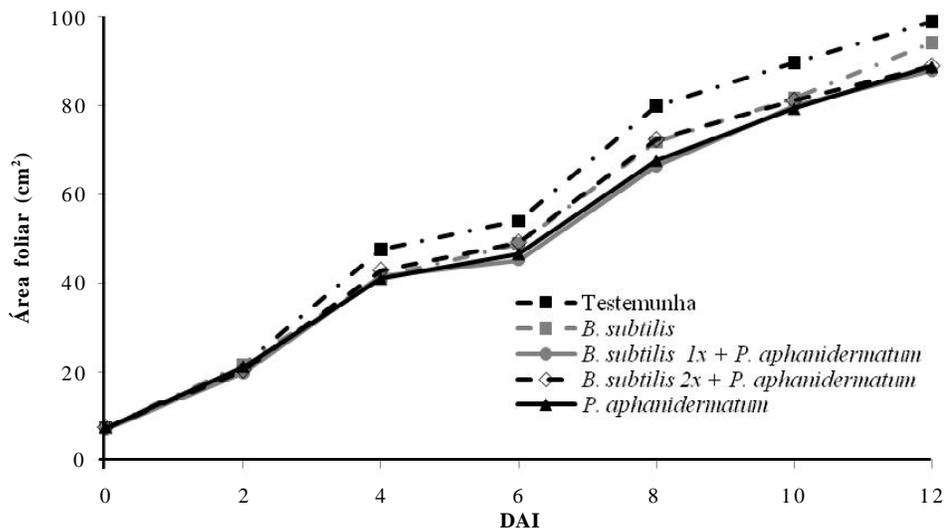


Figura 2. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a introdução na solução nutritiva ou não de *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

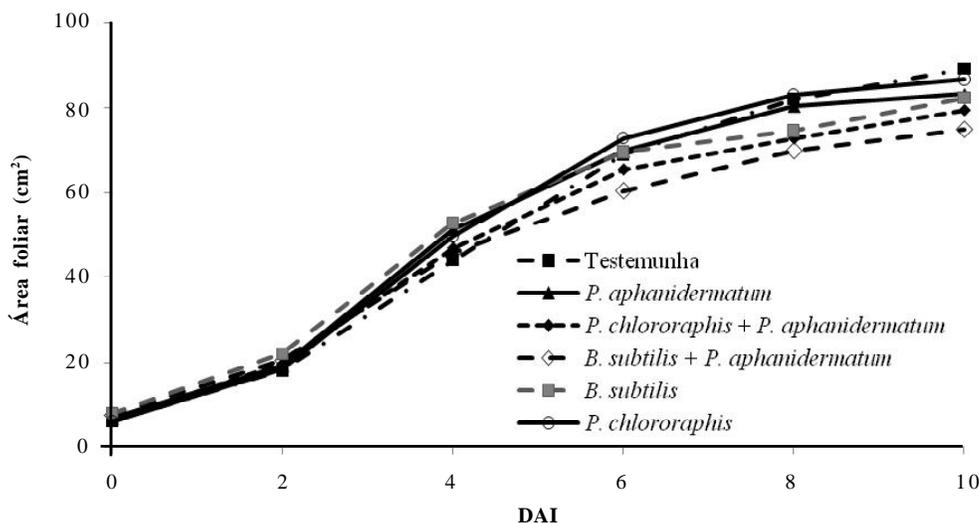


Figura 3. Crescimento foliar de uma folha jovem de alface hidropônica após a aplicação na solução nutritiva ou não de *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 ou *Bacillus subtilis* GB03 (Companion®), sete dias antes e no dia da inoculação ou não com *Pythium aphanidermatum*.

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

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

* Dados não foram significativos pelo teste F.

Diferenças entre os tratamentos não foram verificadas com relação a expansão foliar de alface hidropônica (Figuras 1, 2 e 3) entre as áreas abaixo da curva de crescimento foliar (Tabela 3). Como a metodologia de avaliação da expansão foliar empregada não detectou diferenças entre os tratamentos, nos três experimentos

avaliados (Tabela 3), talvez essa não seja adequada para avaliar os danos iniciais causados pela podridão radicular e o efeito dos tratamentos para o seu controle na cultura da alface.

A adição de *P. chlororaphis* 63-28 causou efeito positivo no número de folhas por planta naquelas não inoculadas com o patógeno (Tabela 4) e na massa das plantas inoculadas (Tabela 1), apesar dos valores não diferirem significativamente das testemunhas. *P. chlororaphis* 63-28 tem se mostrado um eficiente agente de controle biológico e promotor de crescimento de plantas cultivadas em hidroponia (10, 11, 12). McCullagh *et al.* (12) verificaram maior produção das plantas de pepino hidropônicas inoculadas com *P. aphanidermatum* e tratadas com *P. chlororaphis* 63-28, em condições de elevada severidade da doença, em relação as plantas não tratadas com a bactéria. Sopher & Sutton (10) constataram que a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 em pimentão hidropônico suprimiu a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* e promoveu o crescimento das plantas não inoculadas com o patógeno em aproximadamente 20%. Em crisântemo hidropônico a aplicação de *P. chlororaphis* 63-28 ou *P. aureofaciens* TX-1 suprimiu a podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* em temperaturas moderadas (22-25 °C) ou elevadas (32 °C) (11). Dentre os mecanismos de ação conhecidos para bactérias do gênero *Pseudomonas* estão a produção de hormônios de crescimento, antibióticos, sideróforos e competição por espaço e nutrientes (4, 17).

A adição de *B. subtilis* GB03 (Companion®) duas vezes na solução nutritiva das plantas inoculadas com o patógeno aumentou a massa das plantas em 6% (Tabela 2) e quando aplicado duas vezes na solução nutritiva de alface hidropônica não inoculada com o patógeno aumentou o teor de clorofila das plantas no experimento III (Tabela 4). *Bacillus subtilis* GB03 tem como mecanismos de ação a produção de antibióticos e a competição por espaço e nutrientes com patógenos (7). O registro do produto Companion®, à base de *B. subtilis* GB03, é para o controle de doenças causadas por *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp. em diversas culturas, incluindo cultivos hidropônicos, convencionais e orgânicos (7). Efeitos positivos no desenvolvimento de alface hidropônica com a adição de *B. subtilis* na solução nutritiva também foram verificados por Corrêa & Bettiol (2) e Utkhede *et al.* (23). Utkhede *et al.* (23) adicionaram o bioproduto Boost (*B. subtilis*

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

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

* Dados não foram significativos pelo teste F. ** Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste LSD, a 5%. ¹Valores digitais do equipamento SPAD-502, representados pela conversão de sinais elétricos, recebidos por meio da conversão da luz transmitida pelas folhas. *** A avaliação do Experimento III foi realizada aos 20 dias após a inoculação das plantas com o patógeno.

BACT-O) na concentração final de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de solução nutritiva do cultivo de alface e verificaram a promoção de crescimento das plantas inoculadas com *P. aphanidermatum* em 21,5 a 28,4% quando comparado à testemunha inoculada. Corrêa & Bettiol (2) observaram que a introdução na solução nutritiva do meio fermentado por *B. subtilis* AP-3 nas concentrações de 0,1% e 1% de solução nutritiva, ou de células bacterianas na concentração final de 10^4 células mL⁻¹ de solução nutritiva promoveu o crescimento de alface hidropônica, sendo esse aumento de 17% na massa seca das plantas, quando utilizou-se as células da bactéria na concentração de 10^4 células mL⁻¹ (2, 3).

Maiores estudos com relação à capacidade rizosférica, períodos de aplicação e concentrações ideais de *P. chlororaphis* 63-28 e *B. subtilis* GB03 devem ser realizados em alface hidropônica para a validação da capacidade de controle biológico e promoção de crescimento dos agentes de biocontrole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chatterton, S.; Sutton, J. C.; Boland, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. **Biological Control**, San Diego, v.30, n.2, p.360-373, 2004.
- Corrêa, E.B.; Bettiol, W. **Controle biológico da podridão de raízes causada por *Pythium* spp. em cultivos hidropônicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 26 p. (Série Documentos).
- Corrêa, E.B.; Bettiol, W. Avaliação de *Bacillus subtilis* como bioestimulante de alface hidropônica. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras, v. 32, (Supl.), p.252-252, 2007.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: < http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006478.htm>. Acesso em: 15 out. 2009.
- Faquin, V.; Furlani, P.R. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.200/201, p. 99-104, 1999.
- Furlani, P.R. *Pythium* em sistemas hidropônicos – danos e perspectivas para o controle: Principais sistemas hidropônicos em operação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, (Supl.), p.S146-147, 2008.
- Growth Products. *New bioproducts*. Disponível em: < <http://www.growthproducts.com/pages/horticulture.asp?tables=featured&product=10>>. Acesso em: 25 mar. 2009.
- Johnstone, M.B. **Canopy and leaf gas exchange accompanying *Pythium* root rot of lettuce and *Chrysanthemum***. 2001. 126p. Tese (Master of Science in Horticulture) - University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Khan, A.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, n.6, p.615-630, 2003.
- Sopher, C.R.; Sutton, J.C. Beneficial Bacteria Suppress *Pythium* Root Rot and Enhance Growth of Hydroponic Sweet Peppers at Moderate and High Temperatures. Disponível em: <<http://www.canadianca.com/FCKEditor/File/SOPHER.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2011.
- Liu, W.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B.; Kloepper, J.W.; Reddy, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. **Phytoparasitica**, Rehovot, v.35, n.2, p.159-178, 2007.
- Mccullagh, M.; Utkhede, R.; Menzies, J.G.; Punja, Z.K.; Paulitz, T.C. Evaluation of growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v.102, n.8, p.747-755, 1996.
- Owen-Going, T.N.; Sutton, J.C.; Grodzinski. Relationship of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, n. 2, p.155-167, 2003.
- Paulitz, T. Biological control of root rot pathogens in soilless and hydroponic systems. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.2, p.193-196, 1997.
- Paulitz, T.C.; Bélanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.
- Paulitz, T.C.; Zhou, T.; Rankin, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. **Biological Control**, San Diego, v.2, p.226-237, 1992.
- Paulitz, T.; Nowac-Thompson, B.; Gamard, P.; Tsang, E.; Loper, J. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. **Journal of Chemical Ecology**, The Netherlands, v.26, n.6, p.1515-1524, 2000.
- Punja, Z.K.; Yip, R. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.25, n.4, p.411-417, 2003.

19. Rahimian, M.K.; Banihashemi, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucumber seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Report**, St. Louis, v.63, n.8, p.658-661, 1979.
20. Shaner, G.; Finney, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1056, 1977.
21. Stanghellini, M.E.; Kronland, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder roots by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Louis, v.70, n.11, p.1053-1056, 1986.
22. Sutton, J.C.; Sopher, C.R.; Owen-Going, T.N.; Liu, W.; Grodzinski, B.; Hall, J.C.; Benchimol, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n. 4, p.307-321, 2006.
23. Utkhede, R.S.; Lévesque, C.A.; Dinh, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, n. 2, p.138-144, 2000.
24. Veit, S.; Worle, J.M.; Nurnberger, T.; Koch, W.; Seitz, H.U. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 127, n.3, p.832-841, 2001.
25. Zheng, J.; Sutton, J.C.; Yu, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, n.4, p.368-379, 2000.
26. Zinnen, T.M. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. **Plant Disease**, St. Louis, v.72, n.2, p.96-99, 1988.