



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**BACTÉRIAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Phytophthora
nicotianae* E COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

VALDIONEI GIASSI

Araras

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**BACTÉRIAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Phytophthora
nicotianae* E COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

VALDIONEI GIASSI

ORIENTADOR: PROF. Dr^a. KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
**MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL**

Araras

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G435b Giassi, Valdionei
Bactérias como agentes de controle de
Phytophthora nicotianae e como promotoras de
crescimento de porta-enxertos de citros / Valdionei
Giassi. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
60 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Bacillus spp.. 2. Actinobactérias. 3.
Bactérias lácticas. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Valdionei Giassi, realizada em 14/12/2015:

Prof. Dra. Katia Cristina Kupper
IAC

Prof. Dra. Marcia Maria-Rosa Magri
UFSCar

Prof. Dra. Alessandra Alves de Souza
IAC

DEDICO

Aos meus pais, Dinonísio e Otília, por terem sempre me ensinado a ser uma pessoa honesta, meus exemplos de vida e humildade. Minha eterna gratidão pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus queridos irmãos, Vanderléia, Volnei e Samuel por serem a minha força e meus verdadeiros amigos,

Aos meus sobrinhos, João Vinício e Isabela, por serem minha alegria e o pensamento futuro,

A minha companheira, Leikka Iwamura, por seu carinho e companheirismo

OFEREÇO

“Felizes os que reconhecem o erro em tempo, ao tomarem conhecimento da realidade.”

Meishu Sama

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dionisio Giassi e Otilia Casagrande Giassi, irmãos Vanderleia Giassi, Volnei Giassi e Samuel Casagrande Giassi: apesar das dificuldades que passamos sempre permanecemos unidos nessa longa jornada;

À Profa Katia Cristina Kupper, por ter me acolhido no Centro de Citricultura/IAC, pela orientação, paciência e oportunidade de trabalho e conhecimento;

À Universidade Federal de São Carlos/Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO) pela oportunidade e incentivo para a realização do curso de mestrado;

Ao coordenador do CPMO Luiz Carlos Dematte Filho pelo incentivo para a realização desse curso;

A Sergio Kenji Homma por muito ter me ensinado;

Ao Centro de Citricultura/IAC pela oportunidade de realizar esta pesquisa;

Aos amigos que fizeram parte desta etapa da minha vida;

Aos funcionários do Centro de Citricultura/IAC pela disponibilidade e amizade, em especial ao Everaldo Borsonelli;

Aos colegas de trabalho do Laboratório do CPMO, Camila Kiritani, Isabel Cristina de Sousa e Maria Evanir de Almeida Ferreira;

À minha companheira Leikka Iwamura pela paciência e compreensão;

A José Luiz Pinto Perez pela primeira oportunidade de estágio e trabalho na Fundação Mokiti Okada, *in memoriam*;

Ao professor Dr. Hasime Tokeshi pelo conhecimento adquirido.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Agroecologia no contexto da sustentabilidade agrícola	8
2.2 Citricultura	10
2.2.1 Importância econômica e social	10
2.2.2 Produção de Mudanças de Plantas Cítricas	10
2.2.3 Porta-enxerto	11
2.3 Doenças causadas por <i>Phytophthora</i> em citros	12
2.4 Medidas de controle das doenças ocasionadas por <i>Phytophthora</i> em citros	14
2.5 Controle Biológico	15
2.6 Bactérias promotoras de crescimento de plantas	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Micro-organismos	20
3.2 Ensaio de controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	22
3.2.1 Bioensaio com plântulas de alfafa	22
3.2.2 Microbiolização de sementes e, ou substrato com diferentes isolados de bactérias para controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	23
3.2.2.1 Microbiolização de sementes	23
3.2.2.2 Microbiolização de substrato	25
3.3 Seleção de bactérias para promoção de crescimento de porta-enxerto de citros	25
3.3.1 Produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos	25
3.3.1.1 Produção de AIA	25
3.3.1.2 Solubilização de fosfato	26

3.3.1.3	Fixação de nitrogênio	27
3.3.2	Aplicação das bactérias para promoção de crescimento de porta- enxertos de citros	28
4.	RESULTADOS	30
4.1	Ensaio de controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	30
4.1.1	Bioensaio com plântulas de alfafa	30
4.1.2	Microbiolização de sementes e, ou substrato com diferentes isolados de bactérias para controle de <i>P. nicotianae</i>	32
4.1.2.1	Microbiolização de sementes	32
4.1.2.2	Microbiolização de substrato	33
4.2	Seleção de bactérias para promoção de crescimento de porta-enxerto de citros	34
4.2.1	Produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de N pelos isolados bacterianos	34
4.2.1.1	Produção de AIA	34
4.2.1.2	Solubilização de fosfato por bactérias	35
4.2.1.3	Fixação de nitrogênio	35
4.2.2	Aplicação das bactérias para promoção de crescimento de porta- enxertos de citros	36
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÕES	48
7	LITERATURA CITADA	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Número e identificação dos isolados das bactérias; local de isolamento e procedência	21
Tabela 2 - Plântulas sobreviventes de limão Cravo e tangerina Sunki, após a microbiolização das sementes com diferentes isolados bacterianos e, semeadura em substrato inoculado com <i>Phytophthora nicotianae</i>	32
Tabela 3 - Plântulas sobreviventes de limão Cravo e tangerina Sunki, após o tratamento do substrato com diferentes isolados bacterianos e inoculação de <i>Phytophthora nicotianae</i>	33
Tabela 4 - Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e peso seco total de citrumelo Swingle, sob influência de isolados bacterianos	38
Tabela 5 – Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e peso seco total, de porta-enxerto tangerina Sunki, sob influência de isolados bacterianos	39
Tabela 6 - Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e peso seco total de porta-enxerto limão Cravo, sob influência de isolados bacterianos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Seleção de isolados bacterianos quanto ao antagonismo à <i>P. nicotianae</i> , pelo método de infestação de plântulas de alfafa. Nota média para quantidade de micélio por plântula de alfafa.....	31
Figura 2. Seleção de isolados bacterianos quanto ao antagonismo à <i>P. nicotianae</i> , pelo método de infestação de plântulas de alfafa. Nota média para o número de esporângio por plântula de alfafa	31
Figura 3. Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção de AIA.....	34
Figura 4. Índice de solubilização de fosfato (IS= \varnothing Halo (mm) / \varnothing Colônia (mm)).....	35
Figura 5. Nitrogênio total, obtido em meio de cultura com inoculação de bactérias.	36

**BACTÉRIAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Phytophthora
nicotianae* E COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

Autor: VALDIONEI GIASSI

Orientadora: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

A comunidade microbiana tem um papel fundamental na manutenção do equilíbrio ecológico do solo. As interações entre micro-organismos e plantas têm grandes influências sobre a sanidade e a nutrição das mesmas, nesse contexto, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento pode melhorar o desenvolvimento das plantas, por meio de uma ampla variedade de mecanismos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar bactérias como agentes de controle biológico de *Phytophthora nicotianae* e como promotoras de crescimento de porta-enxertos de citros. Ao todo foram avaliados 30 isolados bacterianos, sendo 11 *Bacillus* spp., 11 actinobactérias e 8 bactérias lácticas. Para os ensaios de controle de *P. nicotianae*, inicialmente, foram realizados ensaios com brotos de alfafa com a finalidade de selecionar os isolados bacterianos mais promissores para o biocontrole e, posteriormente, os melhores isolados foram aplicados em plantas de tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan) e limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) pelos métodos de microbiolização das sementes e microbiolização do substrato, avaliando-se o número de plantas sobreviventes 90 dias após a semeadura e inoculação. Os 30 isolados bacterianos foram, também, avaliados *in vitro* quanto à produção de ácido indolacético, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio. Em seguida, para estudo da promoção de crescimento de plantas cítricas, foram realizados testes *in vivo* utilizando três porta-enxertos, citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macfad cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], tangerina Sunki e limão Cravo, sendo utilizados como parâmetros de avaliação, a altura, o número de folhas, o diâmetro do caule, a massa seca da raiz, a massa seca da

parte aérea e a massa seca total. Pelos resultados obtidos verificou-se que o ensaio realizado com brotos de alfafa permitiu avaliar o potencial de biocontrole das bactérias testadas contra *P. nicotianae*; os isolados de bactéria láctica BL06 e BL12 apresentam potencial para serem utilizados como agentes de biocontrole da doença, independente do método de aplicação utilizado; os isolados de *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4 foram capazes de promover o crescimento do porta-enxerto Citrumelo Swingle, enquanto que, BM17 (*Bacillus* sp.) e ACT11 (actinobacteria) promoveram o crescimento de plantas de tangerina Sunki. Para o porta-enxerto limão Cravo, apenas BM05 (*Bacillus* sp.) foi capaz de promover aumento da altura e do número de folhas das plantas.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., actinobactérias, bactérias lácticas, ácido indolacético, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio

BACTERIA AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS TO *Phytophthora nicotianae* AND AS GROWTH-PROMOTING AGENTS FOR CITRUS ROOTSTOCKS

Author: VALDIONEI GIASSI

Adviser: Prof. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

The microbial community plays an essential role in maintaining the ecological balance of soil. Interactions between microorganisms and plants have a major influence on the nutrition and health of the latter, and growth-promoting rhizobacteria can be used to improve plant development through a wide range of mechanisms. Therefore, the objective of the present study was to evaluate bacteria as biological control agents to *Phytophthora nicotianae* and as growth-promoting agents for citrus rootstocks. Altogether were evaluated 30 bacterial isolates, 11 *Bacillus* spp., 11 actinobacteria, and 8 lactic acid bacteria. For *P. nicotianae* control tests at first was performed an bioassay with alfalfa seedling in order to select the most promising bacterial isolates for the biocontrol and, posteriorly, the best isolates were applied in Sunki mandarin (*Citrus sunki* Hort. ex Tan), and rangpur (*Citrus x limonia* Osbeck) by seeds and substrate microbiolization methods. It was evaluated the number of surviving plants, at 90 days after sowing and inoculation. The same Isolates also were evaluated *in vitro* for indoleacetic acid production, phosphate solubilization, and nitrogen (N) fixation. *In vivo* testing consisted of growth promotion trials of the bacterial isolates that yielded the best results on *in vitro* tests with three rootstocks: Swingle citrumelo [*Citrus x paradisi* Macfad cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], Sunki mandarin and rangpur. The parameters of interest were height, number of leaves, stem diameter, shoot and root dry mass, and total dry mass at 150 days after germination. The results showed that alfalfa seedling bioassay

was able to evaluate the potential for biocontrol of bacterial isolates against to *P. nicotianae*, BL06 and BL12 (both lactic acid bacteria) showed potential to be used as biocontrol agents of disease, independently from the application method. BM16 and CPMO4 were able to promote growth of Swingle citrumelo. In Sunki mandarin plants, the best treatment results were obtained with BM17 (*Bacillus* sp.) and ACT11 (actinobacteria). For Rangpur lime rootstock, only BM05 (*Bacillus* sp.) was able to promote increase in two parameters assessed, height and number of leaves.

Keywords: *Bacillus* spp., actinobacteria, lactic acid bacteria, indoleacetic acid, phosphate solubilization, nitrogen fixation

1 INTRODUÇÃO

Os citros são cultivados e comercializados em todo o mundo, sendo uma das culturas de maior destaque econômico. O Brasil é considerado o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado, ocupando uma posição de destaque no cenário mundial, produzindo 80% de todo o suco comercializado mundialmente. Em 2013, o estado de São Paulo foi responsável por cerca de 75% da produção brasileira de laranja e 65% da área colhida no país (735 mil hectares) (FNP Consultoria e Comercio, 2014).

No entanto, a citricultura mundial sofre com diversos problemas fitossanitários, os quais são responsáveis por perdas na produtividade e, conseqüentemente, nos lucros, podendo elevar os custos da produção. Os fitopatógenos do gênero *Phytophthora* são endêmicos do solo e estão presentes na maioria das áreas citrícolas do mundo (MEDINA FILHO et al., 2004). O oomiceto *P. nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur), em citros, pode ocasionar várias doenças que afetam diferentes estágios de desenvolvimento da planta, destacando-se o tombamento; mela ou “damping-off”; lesões em brotos, folhas e hastes; podridão do pé e gomose em tronco e ramos, podridões de raízes e radículas e podridão parda de frutos cítricos (FEICHTENBERGER, 2001).

O controle curativo de *Phytophthora* em tronco e ramos é realizado com pulverizações foliares e pinceladas no tronco com fosetyl-AI. No controle preventivo utiliza-se produtos à base de cobre (FEICHTENBERGER, 2001). O controle de doenças causadas por *Phytophthora* se dá, também, pela aplicação de fosfitos (GRAHAM, 2011) e de fungicidas sistêmicos, como metalaxyl e fosetyl-AI (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Segundo Lopes (2009), sustentabilidade e alimentos mais saudáveis têm sido uma constante exigência da sociedade. Para atender esta demanda, o uso do controle biológico, em substituição ao químico, mostra-se como uma alternativa viável e tecnicamente justificável, por manter a densidade populacional dos fitopatógenos, associados à agricultura, abaixo do limiar de dano econômico, de forma natural e em níveis ecologicamente aceitáveis

(MORETTO, 2000; BETTIOL e MORANDI, 2009). A utilização de microorganismos como bioprotetores em microbiolizações ou, como promotores de crescimento, tem mostrado bons resultados no controle de fitopatógenos (VINALE et al., 2008).

Além dos agentes de controle biológico, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas é considerado uma alternativa para diminuir a utilização de agrotóxicos que encarecem a produção e trazem danos ao meio ambiente. De acordo com a literatura, essas bactérias podem aumentar o crescimento de plantas pela solubilização de fosfatos minerais, fixação de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento, como auxinas e giberelina (COELHO et al., 2007; RICHARDSON et al., 2009).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) vivem na rizosfera ocupando cerca de 5 a 17% da superfície total das raízes (Gray and Simth, 2005). Dentre os gêneros mais estudados, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*. Os efeitos benéficos destes microorganismos têm ação sobre a germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas (AHMAD et al., 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar bactérias como agentes de controle biológico de *P. nicotianae* e como promotoras de crescimento de porta-enxertos de citros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agroecologia no contexto da sustentabilidade agrícola

Com a crescente pressão da agricultura industrial e, mais recentemente, os cultivos transgênicos e a rápida expansão dos agrocombustíveis, houve uma transformação na agricultura mundial. Devido a esses fatores os impactos, econômicos, sociais e ecológicos tem um potencial severo. Esses efeitos podem ser negativos na produtividade de cultivos, devido às mudanças climáticas (ALTIERI, 2010).

Com a chegada da revolução verde, houve uma melhora na produção de certas culturas agrícolas, mas devido às perdas de biodiversidade e do conhecimento tradicional esse modelo se mostrou não ser sustentável, favorecendo os produtores mais ricos e desfavorecendo os produtores mais pobres, tornando-os mais dependentes dos insumos agrícolas (ROSENZWEIG e HILLEL, 2008).

Para Altieri, (1989) a agroecologia tem como objetivo entender a forma, a dinâmica e a função das relações existentes no meio biótico e no meio abiótico do campo, além de considerar a interação com o homem, cujas ações estão pautadas na sua cultura, hábitos e tradições. Tendo-se a idéia de que por meio da compreensão desses processos e relações, os agroecossistemas podem ser manipulados para produzir melhor, inclusive, com menos insumos externos, menos impactos negativos ambientais e sociais, resultando em ambientes mais sustentáveis.

Portanto, a agricultura ecológica incorpora à produção agropecuária, a conservação ambiental, o compromisso social da agricultura em relação aos produtores e consumidores, bem como, a sustentabilidade ecológica dos sistemas de produção (CAMPANHOLA e VALARINI, 2001).

A agroecologia surge como uma necessidade de se construir sistemas mais sustentáveis de produção de alimentos, com as aplicações de conceitos e princípios ecológicos no desenho e manejo de agroecossistemas sustentáveis. Essa proposta de agricultura tem a proposta de maximizar o processo de produção de alimentos, minimizando a utilização dos insumos externos, manejando os agroecossistema para que este se pareça o máximo com o ecossistema natural, conseqüentemente preservando a biodiversidade mantendo um processo altamente produtivo, economicamente viável e ambientalmente consistente sustentável. Portanto se faz necessário um estudo aprofundado da ecologia analisando as interações dos organismos com os fatores bióticos e abióticos (GLIESSMAN, 2001).

2.2 Citricultura

2.2.1 Importância econômica e social

Alguns registros apontam que a laranja é originária do sul asiático, provavelmente, da China. A cultura foi introduzida no Brasil no início da colonização e, devido a sua adaptação as condições climáticas, foi logo se expandindo por todo o território nacional. Desde que começaram as exportações, a citricultura vem contribuindo para o desenvolvimento do Brasil, gerando entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões, representando um importante seguimento na economia brasileira (NEVES et al., 2010).

Para o estado de São Paulo a produção de laranja na safra 2013/2014 foi estimada em 296,8 milhões de caixas. O estado possui, para a atual safra, aproximadamente 10.100 citricultores, cujos pomares totalizam 170,6 milhões de plantas em produção, em uma área de 464,4 mil hectares e 23,0 milhões de pés ainda sem produção, em uma área de 37,3 mil hectares (CONAB, 2013).

2.2.2 Produção de Mudanças de Plantas Cítricas

Tendo em vista o caráter perene da cultura, a muda é um dos insumos mais importantes para a formação de um pomar de citros. O potencial máximo de produtividade e qualidade das frutas será revelado 6 a 8 anos após o plantio, e a longevidade do pomar só será conhecida em um intervalo de tempo ainda maior (TEÓFILO SOBRINHO, 1999). Para Andrade e Martins, (2003) o sucesso na implantação de um pomar de citros está no plantio de mudas de qualidade, sendo, para isso, imprescindíveis a boa formação, o vigor e a sanidade da muda.

A produção de mudas sadias, livres de patógenos causadores de doenças como gomose de *Phytophthora*, cancro cítrico ou clorose variegada dos citros (CVC), além de permitir a formação de pomares típicos da

variedade-copa de alta produtividade, possibilita o enquadramento das mudas cítricas nas normas legais de produção e comercialização, que cada vez compõem mais o cenário dessa atividade (GRAF, 2001).

Atualmente, aplicam-se nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul normas rigorosas para a produção e a comercialização de mudas certificadas, garantindo a sua qualidade genética e fitossanitária. Os porta-enxertos devem ser produzidos, obrigatoriamente, em ambiente protegido de insetos vetores de doenças; o substrato deve ter boa porosidade, ser isento de nematóides e ter ótimas qualidades sanitárias. Além disso, devem ser adotadas uma série de medidas para evitar a incidência de cancro-cítrico, CVC, gomose e mancha-preta (SCIVITTARO et al., 2004).

Com a legislação atual alguns estados brasileiros exigem que as mudas certificadas de citros sejam produzidas em viveiros-telado, utilizando substrato, sementes e borbulhas isentos de patógenos. Essas modificações no processo tradicional de produção de mudas cítricas no Brasil, visam melhorar a qualidade das mesmas (DECARLOS NETO et al., 2002; ROZANE et al., 2009).

2.2.3 Porta-enxerto

Sob as mesmas condições, alguns porta-enxertos se destacam em determinados aspectos e, por esse motivo a escolha e seleção adequada é de importância fundamental para o êxito da atividade citrícola. Assim, o porta-enxerto exerce uma influência direta sobre as copas das plantas cítricas, na adaptação a diferentes condições climáticas, na tolerância às enfermidades virais ou fúngicas e, nos níveis de produção e qualidade de fruta. (AULER et al., 2008).

As instalações de pomares cítricos com mudas enxertadas apresentam diversas vantagens, como precocidade e uniformidade de produção, qualidade e uniformidade dos frutos, facilidade na colheita e nos tratamentos culturais. Com a utilização de porta-enxertos que apresentam adaptação a diferentes tipos de

solo, ocorre maior tolerância a pragas, a seca e melhoram as características agronômicas da cultura (POMPEU JÚNIOR, 2005 e ROZANE et al., 2009).

Os porta-enxertos mais utilizados são o limão Cravo (*Citrus limonia*), tangerina Sunki (*Citrus sunki*), tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni*), citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (SCHÄFER et al., 2001 e POMPEU JUNIOR, 2005).

Segundo Prado et al. (2008), devido à sua tolerância à Gomose e ao declínio, o citrumelo 'Swingle' teve sua expressão de uso nos anos 80 do século passado. As plantas enxertadas sobre esse porta-enxerto apresentavam também boa longevidade e frutos com teor de sólidos solúveis superior às plantas enxertadas sobre outros porta-enxertos.

Dependendo do porta-enxerto, o mesmo poderá favorecer a absorção de nutrientes e água pela planta, influenciar no conteúdo mineral da folha e na eficiência de produção dos frutos cítricos (VALE et al., 2009).

2.3 Doenças causadas por *Phytophthora* em citros

No Brasil, as doenças ocasionadas por *Phytophthora* constituem as principais doenças da cultura dos citros, principalmente, em plantios novos, onde a incidência e a severidade são elevadas. (GRAHAM, 1990; SILVA et al., 2008).

Dentre as doenças causadas por *Phytophthora* spp. em citros, destacam-se a gomose; podridão de raízes e radículas; lesões em folhas, brotos novos e hastes e, podridão parda dos frutos, podendo provocar perdas significativas em viveiros e, em todas as regiões citrícolas do mundo (FEICHTENBERGER et al., 1997).

Devido ao surgimento de doenças como a Tristeza dos Citros, Declínio e CVC, porta-enxertos tiveram que ser substituídos, o que provocou maior incidência de doenças ocasionadas por *Phytophthora* (AMORIM e MELO, 2002).

Phytophthora nicotianae Breda de Haan (sinônimo de *P. parasitica* Dast.) é a espécie mais comum, ocorrendo em áreas subtropicais do mundo todo, causando gomose e podridão de raiz (GRAHAM e FEICHTENBERGER, 2015).

O oomiceto do gênero *Phytophthora* apresenta micélio hialino e cenocítico. A temperatura ótima de crescimento micelial é de 30 a 32°C para *P. nicotianae* e de 24 a 28°C para *P. citrophthora*. Geralmente, os esporângios dessas espécies são de forma globosa, formando nas extremidades os esporangióforos. Os esporos são formados com mais frequência nas estações quentes e chuvosas do ano, com grandes variações de umidade. Em condições favoráveis, a produção dos esporângios pode ser repetida varias vezes. Para a epidemiologia das várias doenças provocadas por esse patógeno a germinação através dos zoósporos é mais importante que a germinação direta pelos esporângios. Ao atingirem a superfície radicular, ou outras partes da planta, os zoósporos germinam, produzindo hifas que podem infectar outras partes das plantas (FEICHTENBERGER et al., 1997).

No Brasil, *P. nicotianae* ocorre em mais de 90% dos casos de viveiros e pomares de citros atingidos pela doença. Escurecimento e morte da casca e do lenho, exsudação de goma, seca e fendilhamento da casca, podridão do pé e das raízes, amarelecimento e queda de folhas, baixo desenvolvimento, murcha, queda de folhas e morte da planta, são os principais sintomas da gomose no campo podendo ser confundidos com os provocados por outros patógenos, insetos e ferimentos químicos ou físicos, gerando confusão e diagnósticos incorretos (SIVIERO et al 2002).

Dependendo da parte da planta infectada, os danos causados pela infecção das espécies de *Phytophthora*, podem ser vários. Sendo um problema sério em pomares adultos e em viveiros. Os primeiros sintomas da “podridão do pé” ou gomose de *Phytophthora* spp. se manifestam após o ataque do patógeno ao tronco e raízes principais, produzindo exsudações de goma em lesões de tronco e colo em porta-enxertos suscetíveis.

Os tecidos infectados da casca se rompem mostrando rachaduras e fendilhamentos longitudinais. Quando as lesões se desenvolvem, circundando

grande parte do caule ou das raízes, a planta entra em rápido declínio, devido à destruição do floema, restringindo o fluxo de seiva elaborada da copa para o sistema radicular provocando a morte da planta (MEDINA FILHO et al., 2003).

Uma das doenças mais importante que afeta a produção de citros no Brasil é a gomose, causada por várias espécies de *Phytophthora*. Tem distribuição mundial e é responsável por 10 a 30% de perdas na cultura de citros em torno do mundo. As altas temperaturas combinadas com alta umidade do solo fornecem condições favoráveis para a infecção e desenvolvimento da doença. Sendo relatada pela primeira vez no Brasil no início do século 20. (SIVIERO et al., 2006).

A *Phytophthora* pode atacar sementes antes ou, após a germinação das mesmas, comprometendo as sementeiras. Também infectam tecidos jovens localizados na base do caulículo, onde aparecem lesões deprimidas e escuras, que podem levar as plântulas à morte, em condições de umidade e temperatura elevadas. (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

2.4 Medidas de controle das doenças ocasionadas por *Phytophthora* em citros

O uso de mudas saudáveis, aumento da matéria orgânica do solo, utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes e produtos químicos sistêmicos são as principais estratégias para controlar as várias doenças causadas por *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 2001; MEDINA FILHO et al., 2004).

O controle químico pode ser muito eficiente, porém, apesar da dificuldade de desenvolvimento de resistência dos fitopatógenos infectantes de raízes a fungicidas, há relatos de resistência de *P. parasítica* a metalaxil. Esse problema, associado aos possíveis impactos no agroecossistema, tem levado à busca de alternativas ao controle químico (LEONI e GHINI, 2003).

No controle curativo de lesões de tronco e ramos, o uso de fosetyl-al pulverizado sobre as folhas e pincelamento de tronco são muito eficientes,

dispensando a retirada dos tecidos infectados e pincelamento dos ferimentos com produto a base de cobre. Para o controle preventivo da podridão das raízes e radículas os produtos Fosetyl-Al e Metalaxyl apresentam melhor funcionamento se quando utilizados via foliar e diretamente ao solo, respectivamente. Já para o controle da podridão parda dos frutos sugere-se que as plantas sejam pulverizadas com fosetyl-Al ou produtos a base de cobre (FEICHTENBERGER, 2001).

2.5 Controle Biológico

A questão do uso dos defensivos agrícolas no Brasil é preocupante, no período entre 1964 e 2004, o consumo de agrotóxicos no país aumentou 700%, sendo que nos últimos três anos o Brasil vem ocupando o lugar de maior consumidor de agrotóxicos no mundo, consumindo em média um bilhão de litros de agrotóxicos por ano (SPADOTTO et al., 2004). Devido aos problemas causados no ambiente pelos produtos químicos a busca por tecnologias tem impulsionado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas, considerados ambientalmente mais seguros. Assim, diversas pesquisas vêm avaliando produtos alternativos que reduzem os problemas fitossanitários (BROETTO et al., 2014).

Uma das alternativas de controle da *Phytophthora* spp., em substituição aos produtos químicos, é o controle biológico, que promove a redução da densidade populacional do inóculo ou, das atividades determinantes da doença provocadas pelo patógeno, no seu estado de atividade ou dormência. Diferente do controle químico o biológico não apresenta efeito imediato ou total, algumas lacunas de conhecimento impedem um melhor entendimento entre patógeno e antagonista (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000).

Para Luz (1993) a maior probabilidade de sucesso ocorre quando o controle biológico é aplicado em nichos ecológicos especiais, como o solo ou substrato recém desinfestados, onde a ocorrência de competitividade microbiana é baixa, baseado na bioprimeirização. O autor destaca a

microbiolização de sementes como uma possível alternativa de controle biológico de fitopatógenos habitantes do solo.

Chen et al. (2012) realizando um experimento para verificar a supressividade de um composto biosólido para *Phyitium* em sementes de pepino, observou que as interações e os processos microbianos, que contribuem para a supressão da doença em mudas de pepino, ocorrem na superfície das sementes e na espermosfera. Os autores concluíram que a supressão da doença causada por *Phyitium* é mediada por bactérias que colonizam a semente dentro de poucas horas após a semeadura.

Micro-organismos antagonistas do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* têm sido avaliados como um meio de controlar podridões radiculares causadas por *Phytophthora* spp.. Amorim e Melo (2002) avaliaram cepas de *Pseudomonas putida* biovar A e biovar B; *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis* contra *P. parasitica* e *P. citrophthora*. Segundo os autores, todos os tratamentos bacterianos promoveram o crescimento das plântulas de citros, tanto para raiz como para parte aérea, quando comparados à testemunha. Os autores observaram ainda que as cepas do gênero *Pseudomonas* em condições de laboratório inibiram o crescimento micelial da *P. parasitica* e *P. citrophthora* em 35,33 a 49,06%, enquanto que os *Bacillus* inibiram em 51,6 a 52,66%. Quando esses mesmos micro-organismos foram utilizados como agentes de biocontrole em plântulas de citros contra *Phytophthora* verificou-se um controle de 43 a 100% pelas cepas de *Pseudomonas* e 85,72 a 100% para as de *Bacillus*.

Os *Bacillus* spp., principalmente o *B. subtilis*, têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial de controle de doenças. Os principais fatores que contribuem para esse controle são a habilidade de produzir vários compostos antimicrobianos, capacidade de competição por espaço e nutriente e eficiência na colonização da rizosfera por longos períodos (HARMAN et al., 2010).

Na indústria alimentícia as bactérias lácticas são amplamente utilizadas como fermentos e, apresentam um papel importante na inibição dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Produzem substâncias antimicrobianas, incluindo o ácido láctico, ácido acético e outros ácidos

orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias semelhantes a bacteriocinas. O ácido lático e o ácido acético causam redução do pH e o peróxido de hidrogênio é um composto termodinâmico não estável que destrói as atividades enzimáticas bacterianas (ÇADIRCI e ÇITAK, 2005). Esses compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas podem ser utilizados com potencial substituto natural dos fungicidas químicos (EL-MABROK et al., 2012). Essas bactérias podem atuar tanto na competição por nutrientes, produção de antibióticos ou substâncias inibidoras Hamed et al. (2011).

Segundo Hamed et al. (2011), recentemente, as bactérias lácticas têm recebido muita atenção pelas suas aplicações na fermentação e preservação de alimentos. Elas são seguras e utilizadas na saúde humana e animal como probióticos. O mecanismo de ação antimicrobiana dessas bactérias é difícil de elucidar devido as suas interações complexas. Muitos dos compostos antimicrobianos afetam as atividades fisiológicas de um agente patogênico, tal como a divisão celular, a biossíntese de DNA, RNA, proteínas, o metabolismo lipídico e da síntese de células. O efeito de antibiótico e de outros compostos produzidos pelas bactérias lácticas tem sido amplamente pesquisado, especialmente em alimentos fermentados.

Murthy et al. (2012) relatam que são poucos os estudos sobre o uso de bactérias lácticas em plantas associada a promoção de crescimento ou ao controle de patógeno. Os autores realizaram um estudo com cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, onde verificaram antagonismo contra *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha do tomateiro e promoção de crescimento das plantas de tomateiro.

O uso do controle biológico da *Phytophthora* pode ser uma alternativa em substituição aos produtos químicos. Considerando os custos financeiros e ambientais dos produtos químicos, poderia ser uma substituição importante e tecnicamente justificável. Porém, são poucos os produtos disponíveis no mercado para esse controle. Além disso, a maioria não é devidamente registrada para uso em escala comercial (SILVA et al., 2008).

2.6 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas vivem na rizosfera, ou seja, na região do solo sob influência da raiz, promovendo assim o crescimento das plantas (NEHL et al., 1997). Essas bactérias ocupam aproximadamente cerca de 5 a 17% da superfície total das raízes (GRAY e SMITH, 2005). Para Richardson et al. (2009), as interações entre as raízes das plantas com as populações microbianas do solo são significativamente importantes para a nutrição e o crescimento das plantas. Além disso, as RPCPs estão entre os grupos de micro-organismos que podem elicitar o sistema de defesa das plantas (KLOEPPER, 2004).

Entre os gêneros mais estudados de rizobactérias, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*. Estes micro-organismos tem ação sobre o desenvolvimento das plantas, incluindo os efeitos benéficos tanto na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas. As RPCPs agem de forma complexa, desta forma as rizobactérias podem apresentar uma combinação de ações positivas para o crescimento das plantas (AHMAD et al., 2008).

Estudos apontam sobre os benefícios advindos das RPCPs na disponibilização de nutrientes para as plantas. A promoção de crescimento de plantas pode ser através da síntese de fito-hormônios, fixação de N₂, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, fazendo com que o fósforo seja disponibilizado para as plantas (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999).

O fósforo é um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento das plantas influenciando vários processos metabólicos, tais como desenvolvimento e divisão celular, transporte de energia, biossíntese de macromoléculas, respiração e fotossíntese das plantas (KHAN et al., 2014). Uma baixa disponibilidade de fósforo ocorre em solos de regiões tropicais o que afeta diretamente a magnitude e frequência de respostas à fertilização com outros nutrientes (WANG et al., 2010). Embora o solo apresente uma reserva de fósforo, uma grande parte não está disponível para as plantas, além disso,

uma parte dos fertilizantes fosfatados, quando aplicado ao solo, se torna indisponível após a sua aplicação (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999). Muitas bactérias que colonizam a rizosfera têm a capacidade de solubilizar o fósforo por meio da produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (COLLAVINO et al., 2010).

Rizobactérias também assimilam as formas inorgânicas de N tornando-as constituintes orgânicos de suas células e tecidos. Os compostos sintetizados pelos micro-organismos podem então ser parcialmente mineralizados tornando-se disponível para as plantas (ALFAIA, 2006). A possibilidade de substituir parcialmente ou, totalmente, as adubações nitrogenadas pelo N atmosférico, fixado por sistemas biológicos, apresenta-se como uma alternativa de grande relevância econômica e ambiental (BHATTACHARJEE et al., 2008). Conhecer a capacidade de um micro-organismo realizar a fixação biológica de nitrogênio é um passo importante para selecionar estirpes com potencial biotecnológico.

O ácido indolacético (AIA) é um regulador de crescimento vegetal da classe das auxinas, produzido no meristema apical das plantas, tendo a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular. A produção de auxinas também pode ser realizada por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (PEREIRA et al., 2012; PATTEN e GLICK, 1996).

Fernandes (2012) aferiu que isolados de bactérias endofíticas promoveram crescimento dos porta-enxertos tangerina Sunki e citrumelo 'Swingle'. Segundo o autor, os isolados bacterianos testados apresentaram de um modo geral, mais de um mecanismo de promoção de crescimento de plantas. O estudo relata, ainda, que as bactérias endofíticas e fungos micorrízicos arbusculares não apresentaram um efeito sinérgico no crescimento das plantas cítricas.

Freitas e Aguilar Vildoso (2004) desenvolveram um trabalho com o objetivo de verificar a ocorrência, a densidade de bactérias e a suas ações como agentes promotores de crescimento. Os resultados obtidos por estes autores apontaram que os isolados bacterianos de *Pseudomonas*

fluorescentes, *Bacillus* e outras bactérias rizosféricas são capazes de agir como promotores do crescimento de plantas cítricas. As *Pseudomonas fluorescences* 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 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Para a realização deste trabalho foram avaliados onze isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp. (BM001, BM05, BM16, BM17, BM18, BM24, CPMO2, CPMO3, CPMO4, CPMO5 e CPMO6), oito isolados de bactérias lácticas (BL01, BL06, BL10, BL12, BL14, BL16, BL24 e BL29) pertencentes à coleção de micro-organismos do Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO), Ipeúna – SP e, onze isolados de actinobactérias (ACT01, ACT02, ACT05, ACT06, ACT07, ACT08, ACT10, ACT11, ACT14, ACT15 e ACT16), além do isolado de *P. nicotianae* (IAC 01/95), todos pertencentes à coleção de micro-organismos do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC – Cordeirópolis, SP. (Tabela1)

Tabela 1 Número e identificação dos isolados das bactérias; local de isolamento e procedência

Nº isolado	Identificação	Hospedeiro	Procedência
BM01	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
BM05	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
BM16	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
BM17	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
BM18	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
BM24	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de morangueiro	Atibaia - SP
CPMO2	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de café	Ipeuna - SP
CPMO3	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de café	Ipeuna - SP
CPMO4	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de café	Ipeuna - SP
CPMO5	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de café	Ipeuna - SP
CPMO6	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de café	Ipeuna - SP
BL01	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL06	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL10	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL12	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL14	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL16	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL24	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
BL29	Bactéria lática	Fermento de água ardente	Jacinto Machado - SC
ACT01	Actinobactéria	Citros	Tambaú
ACT02	Actinobactéria	Citros	Santa Rita do Passa Quatro
ACT05	Actinobactéria	Citros	Santa Rita do Passa Quatro
ACT06	Actinobactéria	Citros	Paranapanema
ACT07	Actinobactéria	Citros	Catanduva
ACT08	Actinobactéria	Citros	Cordeirópolis
ACT10	Actinobactéria	Citros	Jaboticabal
ACT11	Actinobactéria	Citros	Descalvado
ACT14	Actinobactéria	Citros	Jaboticabal
ACT15	Actinobactéria	Citros	Jaboticabal
ACT16	<i>Streptomyces griseus</i>	Comercial	Fundação André Tosello

3.2 Ensaios de controle de *Phytophthora nicotianae*

3.2.1 Bioensaio com plântulas de alfafa

Com objetivo de identificar os isolados mais promissores para o biocontrole de *P. nicotianae*, primeiramente realizou-se um bioensaio de prospecção segundo metodologia descrita por Leoni e Ghini (2003). Neste ensaio, sementes de alfafa (*Medicago sativa*) previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (2% v/v) foram colocadas para germinar. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para bandejas de polietileno contendo 42 células com capacidade para 2 mL cada. Em cada compartimento foram adicionados: 2 mL de ADE (água deionizada estéril), uma plântula de alfafa, um disco de 5 mm de diâmetro de meio CA (ágar cenoura) contendo micélio do isolado de *P. nicotianae* (IAC 01/95) fornecido pelo Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – Instituto Agrônômico de Campinas (CCSM – IAC) e um disco de 5 mm do meio contendo os isolados bacterianos a serem avaliados quanto ao seu potencial antagonico. As testemunhas foram constituídas por plântulas de alfafa em compartimentos contendo água esterilizada, e plântulas em água esterilizada e *P. nicotianae*.

Para a obtenção dos discos dos isolado bacterianos o cultivo se deu em meio de cultura específico para cada gênero, para *Bacillus* spp. utilizou-se o meio de cultura NA (Nutriente Ágar, HIMEDIA[®]) e as culturas foram incubadas em estufa para BOD a 28°C por 24 horas (AMORIM e MELO, 2002). Para o cultivo de bactérias láticas utilizou-se o meio ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS), (KASVY[®]) (BRASHEARS et al., 2003) e, incubadas por 48 horas a 35°C. Os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio Amido-Caseína-Ágar (ACA) (10 g de amido; 0,3 g de Caseína; 2,0 g de Nitrato de Potássio; 2,0 g de NaCl; 2,0 g de Fosfato de Potássio dibásico; 0,05 g de Sulfato de Magnésio; 0,01 g de Sulfeto Ferroso; 20 g de ágar; 1000 mL de água destilada) e incubadas por 10 dias a 28°C (FRIGHETTO e VALARINE, 2000).

As bandejas, contendo as plântulas de alfafa de acordo com os respectivos tratamentos, foram mantidas à temperatura ambiente, com fotoperíodo 12/12 h, e após quatro dias, um fragmento de 20 mm da extremidade inferior da radícula foi cortado, corado em azul lático e levado para avaliação em microscópio óptico de luz.

Neste bioensaio, para determinar o potencial de um isolado como antagonista, foram utilizadas duas escalas de notas, que classificaram os níveis de infecção de *P. nicotianae* nas plântulas de alfafa. Para a presença de esporângios (Z) as notas foram 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios. Para a presença de micélio (M) as notas foram 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio. O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.2 Microbiolização de sementes e, ou substrato com diferentes isolados de bactérias para controle de *Phytophthora nicotianae*

Para realização deste estudo foram utilizados os isolados bacterianos que se apresentaram mais promissores para o controle de *P. nicotianae*, conforme os resultados obtidos no ensaio de bioprospecção com plântulas de alfafa. Os micro-organismos avaliados foram: CPMO3 e CPOM5 (*Bacillus* spp.); BL01, BL06, BL10, BL12, BL14 e BL16 (bactérias láticas) e ACT10 (actinobactéria).

3.2.2.1 Microbiolização de sementes

Este experimento foi conduzido conforme metodologia adaptada de Amorim e Melo (2002). Sementes de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e

tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan) foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0.7 % por 5 minutos e lavadas em água destilada e esterilizada. Após 24 horas à 25°C, as sementes foram imersas em suspensões das bactérias (1×10^7 cel/mL) por 1 hora. Após a secagem por 2 horas, três sementes foram semeadas em tubete de 150cm³ contendo substrato 'Plantmax' esterilizado a 121°C e a 1 atm por 2 horas. As testemunhas consistiram de sementes desinfestadas e imersas em água destilada e esterilizada, com ou sem inoculação de *Phytophthora*. Em seguida procedeu-se a infestação artificial do substrato com 5 mL da suspensão de inoculo de *P. nicotianae*, no ato da semeadura.

Para a produção de inoculo de *P. nicotianae* foi utilizada a metodologia descrita por Medina Filho et al. (2003). Discos de micélio do patógeno foram retirados de colônias ativas e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-ágar (CA). As culturas foram mantidas a 24° C, no escuro, por seis dias, até o crescimento do micélio em toda a superfície do meio. Metade das placas foi mantida sob luz fluorescente contínua, durante cinco dias, para promover o desenvolvimento de esporângios, enquanto que a outra metade permaneceu no escuro, à mesma temperatura. Todas as placas foram posteriormente mantidas no escuro, por mais três dias. O conteúdo de quatro placas foi composto por diferentes propágulos do patógeno, incluindo micélio, esporângios e clamidósporos, os quais foram homogeneizados no liquidificador por 1 min, diluindo-se essa suspensão com 800 mL de água destilada.

Após os tratamentos e inoculação, os tubetes foram mantidos em uma sala com temperatura controlada 25°C±3°C. Foi avaliado o número de plantas sobreviventes 90 dias após a semeadura. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de três plantas/tubete. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). O ensaio foi realizado em duplicata.

3.2.2.2 Microbiolização de substrato

Três sementes de limão Cravo e tangerina Sunki foram higienizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% v/v, por 60s e semeadas a 15 mm de profundidade em tubete de 150 cm³ contendo substrato comercial Plantmax[®] esterilizado a 121°C a 1 atm por 2 horas. Em seguida, 5 mL de suspensão de cada bactéria (1×10^7 cel/mL) foi adicionada ao substrato, conforme o tratamento. Vinte e quatro horas depois, o tubete recebeu mais 5 mL da suspensão de inóculo do fitopatógeno, preparado como mencionado no item anterior (item 3.2.2.1). Nos tratamentos correspondentes às testemunhas, o substrato recebeu água no lugar da suspensão bacteriana, com ou sem inoculação de *Phytophthora*. Após os tratamentos e inoculação, os tubetes foram mantidos em uma sala com temperatura controlada 25°C±3°C. Foi avaliado o número de plântulas sobreviventes 90 dias após a semeadura. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo três plantas por repetição e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). O ensaio foi realizado em duplicata.

3.3 Seleção de bactérias para promoção de crescimento de porta-enxerto de citros

3.3.1 Produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos

3.3.1.1 Produção de AIA

Para verificar a produção de AIA, os isolados bacterianos foram inicialmente cultivados em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 100 mL contendo 50 mL do meio TSB 10% (15 g de triptona; 5 g de peptona de soja; 1 g de triptofano; 8 g NaCl; 1000 mL de água deionizada; pH 7,0). Cada frasco

recebeu 1 mL de suspensão bacteriana ($1,0 \times 10^7$ células/mL) e, em seguida, as culturas foram mantidas sob agitação a 150 rpm durante 72 h a 28°C. Após a incubação, uma alíquota de 2 mL de cada cultura foi submetida à centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, em 1,5 mL do sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de reagente de Salkowski (7,5 mL de FeCl_3 0,5 M; 150 mL de H_2SO_4 concentrado; 250 mL de água destilada) (PATTEN e GLICK, 2002). Após 20 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (ASGHAR et al., 2002). Para o controle utilizou-se o meio sem a adição da suspensão da bactéria.

Para a determinação da concentração de AIA, foi preparada uma curva de calibração com diferentes concentrações definidas de AIA comercial (0, 2, 4, 10, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 31 tratamentos e três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.3.1.2 Solubilização de fosfato

Para a avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi utilizada a metodologia descrita por Verma et al. (2001) e Rodríguez et al. (2000). As bactérias foram cultivadas em meio contendo fosfato insolúvel com algumas modificações (10 g de glicose; 5 g de NH_4Cl ; 1 g de NaCl ; 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 g de CaHPO_4 ; 15 g de ágar e pH 7,2; 1000 mL de água deionizada). Para o cultivo das bactérias no meio, uma alçada de cada bactéria foi retirada de colônia ativa e transferida para pontos marcados no meio contido em placa de Petri, a incubação das culturas foi 28°C. A avaliação foi determinada pela presença de um halo em torno da colônia, indicando a solubilização do fosfato. Os isolados foram avaliados após 10 dias. A medida do diâmetro (\varnothing) do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, foi mensurada com a utilização de um paquímetro digital. A

partir da obtenção da medida, obteve-se o índice de solubilização de fosfato de cada isolado por meio da fórmula: $IS = \varnothing \text{ Halo (mm)} / \varnothing \text{ Colônia (mm)}$, descrito por Hara e Oliveira (2004). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada em baixa solubilização ($IS < 2$), média solubilização ($2 \geq IS \leq 3$) e alta solubilização ($IS > 3$). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.3.1.3 Fixação de nitrogênio

Para o teste de fixação de N, as bactérias foram cultivadas em tubos de ensaio de 20x70 mm, contendo 10 mL de meio de cultura FBN (fixação biológica de N) semissólido [5 g de ácido málico; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,01 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4 mL de Fe. EDTA (solução 1,64%); 2 mL por litro de azul de bromotimol (0,5%); 2 mL por litro de solução de micronutrientes (0,2 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,235 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,28 g de H_3BO_3 ; 0,008 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1000 mL de água deionizada); 1,75 g por litro de ágar; pH 6,8] (DÖBEREINER et al., 1995). Cada tubo recebeu 0,5 mL de suspensão da bactéria ($1,0 \times 10^7$ células/mL). Como controle, utilizou-se meio de cultura sem os isolados microbianos. As culturas foram incubadas em estufa BOD a 28°C por sete dias (KUSS et al., 2007). Da cultura (meio + conteúdo celular) foram vertidos 10 mL em tubos, para digestão pelo método semi-micro Kjeldahl (MALAVOLTA et al., 1997)

Para digestão, adicionaram-se a cada tubo com as células lisadas 0,7 g de mistura de digestão 100 g de Na_2SO_4 ; 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1 g de selênio em pó; 1 mL de H_2O_2 e 2 mL de H_2SO_4 , nesta ordem. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor por 2 horas a 180°C e a temperatura foi elevada para 360°C e, mantida até que a mistura apresentasse a cor verde-palha. Ao atingir a cor, aguardou-se que a temperatura da mistura se reduzisse a

aproximadamente 40°C, para completar o volume com água destilada para 10 mL. Procedeu-se à destilação com NaOH e à titulação das soluções, para quantificação do N total (Nt) (MALAVOLTA et al., 1997). O cálculo de Nt fixado foi apresentado em microgramas em 1 mL de meio

Foram utilizadas três repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade através do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.3.2. Aplicação das bactérias para promoção de crescimento de porta-enxertos de citros

Para esse estudo foram utilizados dezesseis isolados bacterianos: *Bacillus* spp. BM001, BM05, BM16, BM17, BM24, CPMO2, CPMO3, CPMO4, CPMO5 e CPMO6; bactérias lácticas BL06, BL16; actinobactérias ACT01, ACT05, ACT11 e ACT15, que foram selecionados conforme os resultados obtidos em ensaios anteriores (item 3.3.1).

Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, com sementes de limão Cravo, tangerina Sunki e citrumelo Swingle provenientes do setor de Borbulhas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/SP.

As mudas foram produzidas em tubetes com capacidade de 50 cm³, utilizando o substrato vegetal sem esterilização. Durante o experimento as plantas receberam duas soluções nutritivas as quais foram intercaladas a cada quinze dias. Solução 1: nitrato de amônia 0,4 g; nitrato de cálcio 1,0 g; sulfato de zinco 0,006 g; sulfato de manganês 0,008 g; sulfato de cobre 0,008 g; sulfato de ferro 0,03 g; 1000 mL de água. Solução 2: nitrato de amônia 0,45 g; fosfato monoamônico 0,1 g; nitrato de potássio 0,51 g; sulfato de magnésio 0,83 g; sulfato de zinco 0,012 g; sulfato de ferro 0,03 g; 1000 mL de água.

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio específico NA (nutriente ágar, Himedia[®]) para *Bacillus* spp. (BM01, BM05, BM16, BM17, BM24, CPMO2, CPMO3, CPMO4, CPMO5 e CPMO6) e incubadas em estufa

para BOD a 28°C por 24 horas (AMORIM e MELO, 2002); para o cultivo de bactérias lácticas (BL06 e BL16) foi utilizado o meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), Kasvy® (BRASHEARS et al., 2003) e, incubadas por 48 horas a 35°C. Os isolados de actinobactérias (ACT01, ACT05, ACT11 e ACT15) foram cultivados em meio Amido-Caseína-Ágar (ACA) (10 g de amido; 0,3 g de caseína; 2,0 g de nitrato de potássio; 2,0 g de NaCl; 2,0 g de fosfato de potássio dibásico; 0,05 g de sulfato de magnésio; 0,01 g de sulfeto ferroso; 20 g de ágar; 1000 mL de água destilada) e as culturas incubadas por 10 dias a 28°C (FRIGHETTO e VALARINE, 2000). Foi acrescentado um tratamento com misturas de bactérias, (BM24, BL06 e ACT05) nas mesmas proporções, o crescimento dessas bactérias ocorreu separadamente e misturadas no ato da aplicação.

Para o preparo do inóculo bacteriano, foram adicionados 15 mL de água salina estéril (0,85% NaCl, com adição de Tween 80 na concentração de 0,05%) em cada placa de Petri contendo as culturas dos micro-organismos, e com o auxílio de alça de platina, foi feita a raspagem das colônias e transferidas para uma solução salina (0,85% NaCl) em seguida, foi feita a calibragem da concentração das colônias em câmara de Neubauer. Cinco mL de suspensão (1×10^7 células/mL) de cada isolado de bactéria foi adicionada em cada tubete aos 60 dias após a semeadura. Foi adicionado, também, um tratamento com mistura dos isolados, constituída do isolado BM24 (maior produtor de AIA), BL06 (maior solubilizador de fosfato) e ACT05 (um dos que mais fixou N). Como testemunha, foram usadas plantas tratadas com água no lugar da bactéria. Aos 120 dias após a semeadura, as plantas foram novamente tratadas com as bactérias (metodologia adaptada de FREITAS e AGUILAR VILDOSO, 2004).

Os parâmetros avaliados foram altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea e peso total da planta, aos 150 dias após a semeadura.

Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta. Os dados foram analisados separadamente para cada variedade. Os

dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Esse experimento foi realizado em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de controle de *Phytophthora nicotianae*

4.1.1 Bioensaio com plântulas de alfafa

Nos testes com plântulas de alfafa, os resultados apresentados mostraram que a maioria dos isolados bacterianos diminuiu a presença de micélios e, quando se compara o grupo de bactérias verifica-se que, 82% dos isolados de actinobactérias e de *Bacillus* spp. reduziram tais estruturas do fitopatógeno. Nenhum isolado de bactéria láctica testado foi capaz de reduzir a quantidade de micélios. Por outro lado, todos os isolados da bactéria láctica diminuíram o número de esporângios e, dentre esses os isolados BL16, BL06, BL12, BL14 apresentaram 100% de inibição. Com relação aos outros grupos bacterianos, somente dois isolados de *Bacillus* spp. (CPMO5 e CPMO3) e um isolado de actinobactéria (ACT10) foram capazes de reduzir o número de esporângios. Os isolados ACT10, CPMO3 e CPMO5 reduziram tanto a formação de esporângios quanto à quantidade de micélio de *P. nicotianae* (figura 1 e 2).

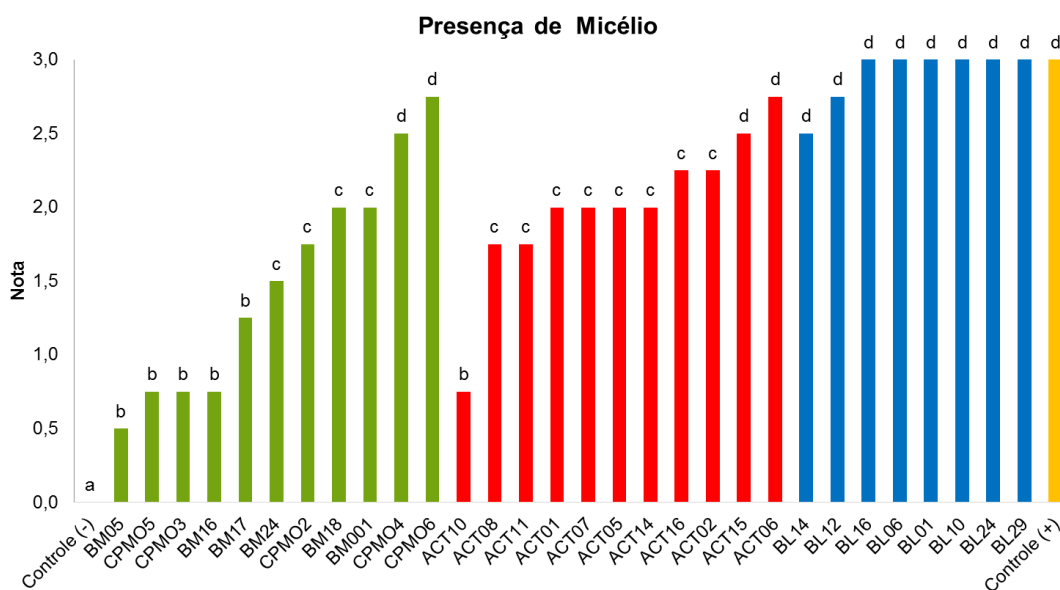


Figura 1 - Seleção de isolados bacterianos quanto ao antagonismo à *P. nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa. Nota média para quantidade de micélio por plântula de alfafa. Escala de notas para quantidade de micélio, onde: 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 0,5$.

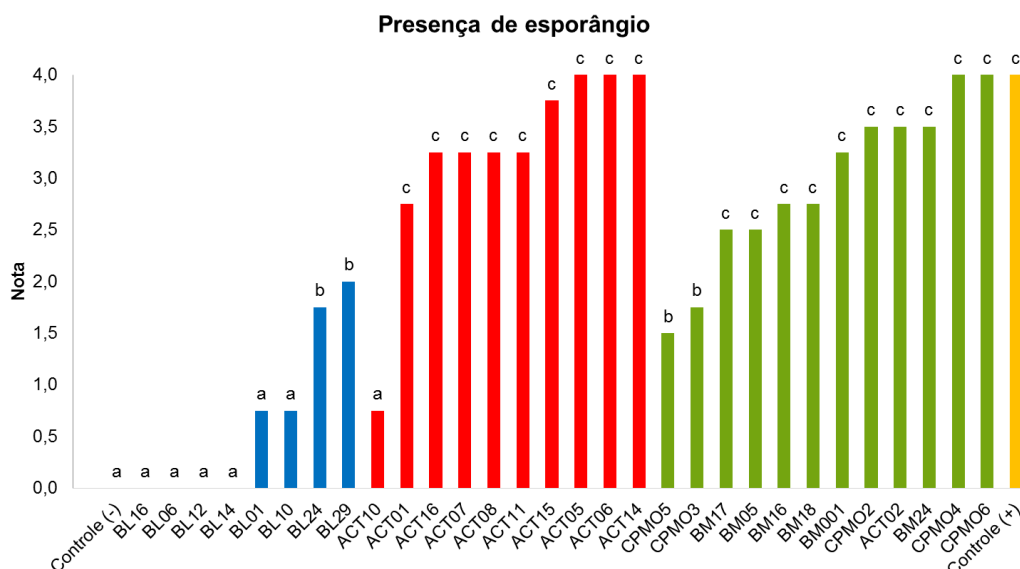


Figura 2 - Seleção de isolados bacterianos quanto ao antagonismo à *P. nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa. Nota média para o número de esporângio por plântula de alfafa. Escala de notas para número de esporângios, em que: 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 0,5$.

4.1.2 Microbiolização de sementes e, ou substrato com diferentes isolados de bactérias para controle de *P. nicotianae*.

4.1.2.1 Microbiolização de sementes

Quando se avaliou a microbiolização das sementes com os diferentes isolados bacterianos, observa-se que para o porta-enxerto limão cravo somente os isolados BL10, BL14, BL12 e BL06 controlaram a doença, diferiram do tratamento testemunha, com porcentagens de plantas sobreviventes que variaram de 100, 92, 92 e 92%, respectivamente. Já para a variedade tangerina Sunki todos os isolados testados mostraram eficiência significativa para o controle de *P. nicotianae*, com porcentagens de sobrevivência das plantas que variaram de 58% (BL01) a 92% (CPMO5) (Tabela 2).

TABELA 2 - Plântulas sobreviventes de limão Cravo e tangerina Sunki, após a microbiolização das sementes com diferentes isolados bacterianos e, semeadura em substrato inoculado com *Phytophthora nicotianae*.

Tratamentos	Microbiolização sementes			
	Limão Cravo*	% plântulas sobreviventes	Sunki*	% plântulas sobreviventes
Controle não inoculado	3,00 ^(v) a ⁽¹⁾	100,0	2,50a	83,3
BL10	3,00a	100,0	2,50a	83,3
BL14	2,75a	91,7	2,00a	66,7
BL12	2,75a	91,7	2,50a	83,3
BL06	2,75a	91,7	2,50a	83,3
ACT10	2,50ab	83,3	2,00a	66,7
CPMO3	2,25ab	75,0	2,50a	83,3
BL16	2,25ab	75,0	2,25a	75,0
BL01	2,25ab	75,0	1,75a	58,3
CPMO5	2,00ab	66,7	2,75a	91,7
Controle inoculado	1,50b	50,0	0,75b	25,0
CV%	11,3		18,55	

^(v) Média de plantas sobreviventes por tubete. ⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dados transformados \sqrt{x} .

4.1.2.2 Microbiolização de substrato

Os dados apresentados na Tabela 3 indicam a média de plantas sobreviventes nas duas variedades de porta-enxertos (limão Cravo e tangerina Sunki), 90 dias após os tratamentos do substrato com os isolados bacterianos. Quando se observam as plantas de limão Cravo, nota-se que, com exceção dos isolados CPMO3 (*Bacillus* spp.) e BL14 (bactéria láctica), os demais controlaram a doença, com porcentagens médias de sobrevivências das plantas que variaram de 83% (BL06, BL12, BL16 e BL01) a 92% (BL10, CPMO5 e ACT10). Para a tangerina Sunki, com exceção do BL14 todos os isolados testados controlaram a doença, com porcentagens de plantas sobreviventes que variaram de 67% (BL16), 75% (BL10), 83% (CPMO5), 92% (BL01 e BL12) a 100% (BL06).

TABELA 3 - Plântulas sobreviventes de limão Cravo e tangerina Sunki, após o tratamento do substrato com diferentes isolados bacterianos e inoculação de *Phytophthora nicotianae*.

Tratamentos	Microbiolização substrato			
	Limão Cravo*	% plântulas sobreviventes	Sunki*	% plântulas sobreviventes
Controle não inoculado	3,00 ^(v) a ⁽¹⁾	100,0	2,50ab	83,3
BL10	2,75 ^a	91,7	2,25ab	75,0
CPMO5	2,75 ^a	91,7	2,50ab	83,3
ACT10	2,75 ^a	91,7	2,25ab	75,0
BL01	2,50ab	83,3	2,75 ^a	91,7
BL16	2,50ab	83,3	2,00ab	66,7
BL12	2,50ab	83,3	2,75 ^a	91,7
BL06	2,50ab	83,3	3,00 ^a	100
CPMO3	2,00abc	66,7	2,25ab	75,0
BL14	1,25bc	41,7	1,50bc	50,0
Controle inoculado	0,75c	25,0	1,00c	33,3
CV%	19,6		10,2	

^(v) Média de plantas sobreviventes por tubete. ⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dados transformados \sqrt{x} .

4.2 Seleção de bactérias para promoção de crescimento de porta-enxerto de citros

4.2.1 Produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos

4.2.1.1 Produção de AIA

Dos 30 isolados bacterianos estudados em laboratório, com exceção do isolado BL24, os demais foram capazes de produzir AIA. Todos os isolados de *Bacillus* spp. e de actinobactérias produziram o AIA, sendo os maiores valores obtidos dentro de cada grupo, pelos isolados BM24 ($21,07 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ACT15 ($10,59 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente. Com relação às bactérias lácticas o isolado BL12 foi o que mais se destacou, produzindo $5,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (figura 3).

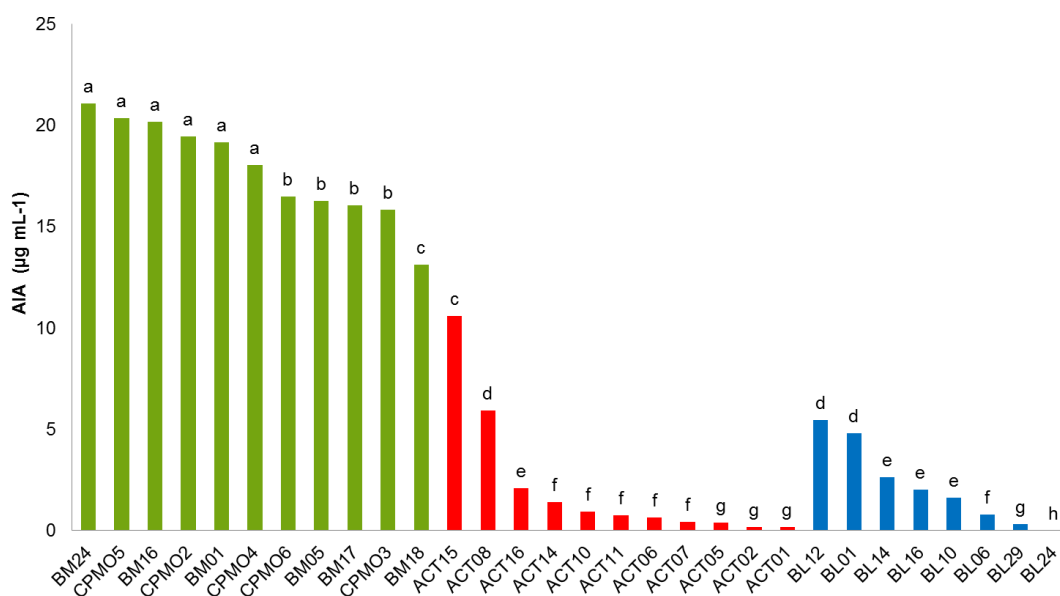


Figura 3 - Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção de AIA. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). Dados transformados \sqrt{x} .

4.2.1.2 Solubilização de fosfato por bactérias

Quanto à solubilização de fosfato, observou-se que das oito bactérias láticas avaliadas, apenas o isolado BL06 solubilizou, com um índice de solubilização alto ($IS > 3$). Considerando o grupo das actinobactérias os isolados ACT01 ($IS=2,09$) e ACT07 ($IS=2,01$) apresentaram média solubilização de fosfato, enquanto que, com exceção do ACT10 que não foi capaz de solubilizar fosfato, os demais apresentaram uma baixa solubilização ($IS < 2$). Para os isolados de *Bacillus* spp., somente os isolados CPMO6 e BM17 solubilizaram fosfato com um índice de solubilização de 1,48 e 1,38, considerado baixo (figura 4).

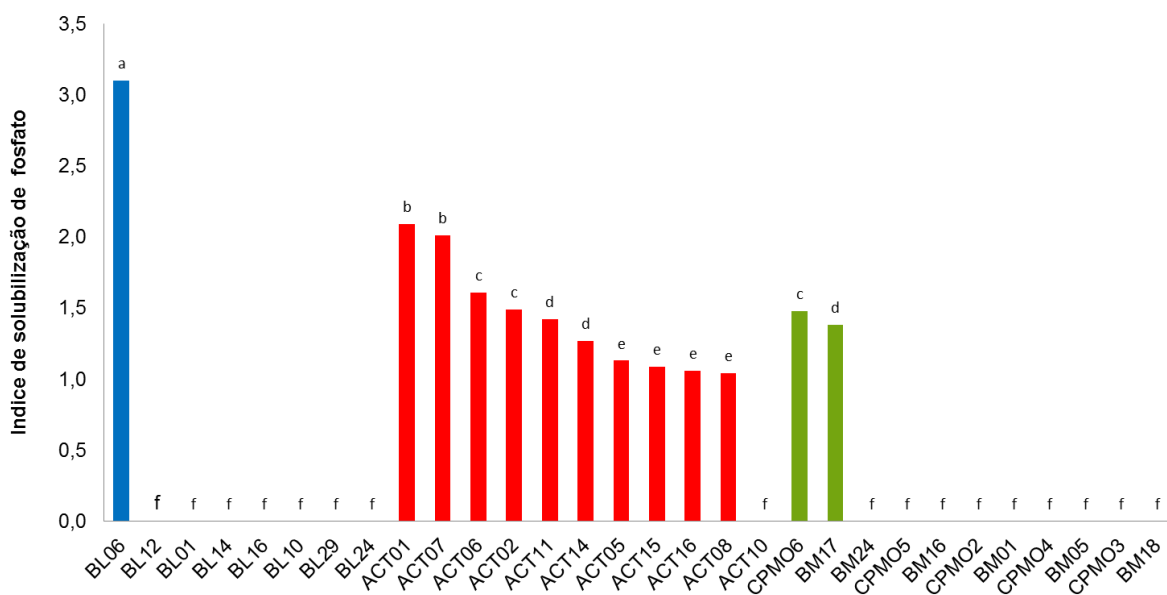


Figura 4 - Índice de solubilização de fosfato ($IS = \frac{\varnothing \text{ Halo (mm)}}{\varnothing \text{ Colônia (mm)}}$). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados \sqrt{x} .

4.2.1.3 Fixação de nitrogênio

Quando se avaliou a fixação de N pelos isolados de *Bacillus* spp., verificou-se que a maioria foi capaz de fixar o elemento, com valores que

variaram de 6,23 (CPMO6) a 56,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (BM17). Os isolados BM01, BM05 e BM18 não fixaram N. Em relação ao grupo das actinobactérias somente dois isolados ACT08 e ACT07 não fixaram, enquanto que, os demais apresentaram valores de fixação que variaram de 5,28 (ACT06) a 61,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ACT11). Dentre as bactérias lácticas, somente três fixaram N, BL06, BL16 e BL24, com valores correspondentes a 34,57; 35,57 e 40,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 5).

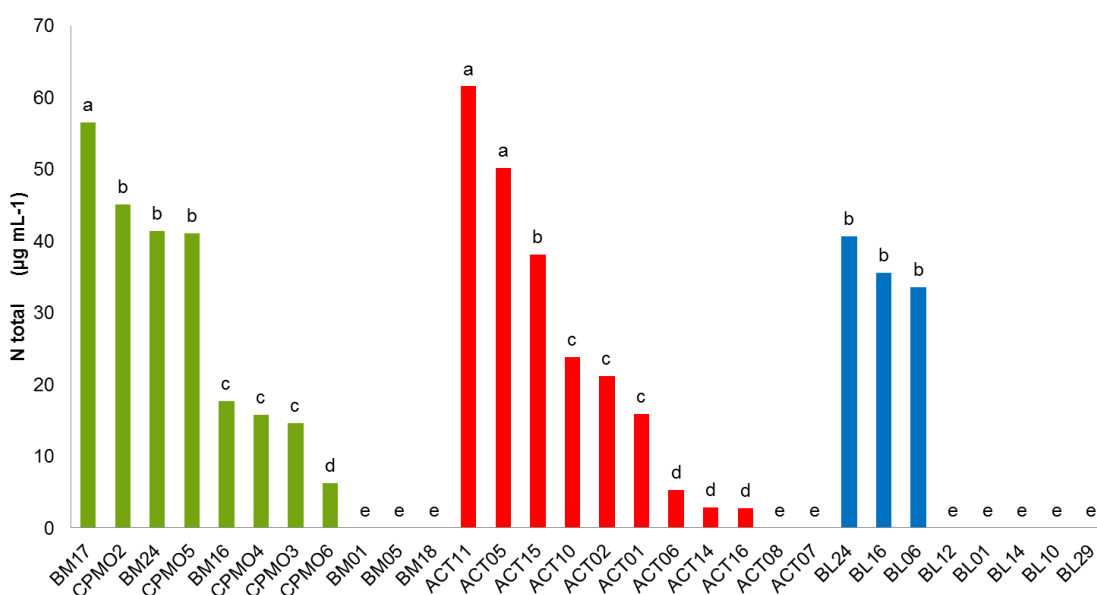


Figura 5 - Nitrogênio total, obtido em meio de cultura com inoculação de bactérias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). Dados transformados $\sqrt{x + 1}$.

4.2.2 Aplicação das bactérias para promoção de crescimento de porta-enxertos de citros

Quando se avaliou a capacidade dos isolados das bactérias em promover o crescimento do porta-enxerto citrumelo Swingle, verificou-se que, com exceção do BL16 (bactéria láctica) e do tratamento com mistura de isolados, os demais isolados testados proporcionaram aumento significativo na altura das plantas com valores que variaram de 6 a 11 cm em relação ao controle. O aumento significativo do número de folhas nas plantas foi observado

quando os isolados de *Bacillus* spp. BM24, CPMO4 e BM16 foram aplicados, proporcionando aumentos do número de folhas que variaram de 35 a 37% em relação ao controle. Para o diâmetro do caule das plantas foi observado um aumento significativo quando os tratamentos com *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4; com as actinobactérias ACT05 e ACT15 e, com a bactéria láctica BL06 foram aplicados. Apenas quatro isolados de *Bacillus* spp. (BM16, CPMO4, BM24 e BM01), um isolado de actinobactéria (ACT05), um isolado de bactéria láctica (BL06) e a mistura dos isolados foram capazes de aumentar, significativamente, a massa seca das raízes diferindo do controle. Com relação à massa seca da parte aérea, os tratamentos que proporcionaram maiores aumentos deste parâmetro avaliado foram os isolados de *Bacillus* spp. CPMO4, BM05, BM01, BM16, BM17, BM24; de actinobactérias ACT05, ACT11, ACT15, e da bactéria láctica BL06. Quando se avaliou a massa seca total das plantas observou-se um aumento significativo (115% a 171%) nos tratamentos BM01, BM05, BM16, BM17, BM24 e CPMO4 (*Bacillus* spp.); ACT05, ACT11 e ACT15 (actinobactérias) e BL06 (bactéria láctica). Os isolados de *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4 proporcionaram o desenvolvimento das plantas em todos os parâmetros avaliados. BM16 aumentou a altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e massa seca da parte aérea em 89, 37, 31, 193 e 171%, respectivamente, enquanto que, o CPMO4 aumentou os parâmetros em 73% (altura), 37% (número de folhas), 31% (diâmetro do caule), 171% (massa seca da raiz) e 145% (massa seca da parte aérea), quando em comparação com o controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e massa seca total de citrumelo Swingle, sob influência de isolados bacterianos.

Tratamento	Altura (cm)	Nº folhas	Diâmetro Caule (cm)	Massa seca (g)		
				Raiz*	Parte aérea*	Total*
BM16	22,56 a ⁽¹⁾	16,40 a	0,38 a	0,41 a	1,03 a	1,44 a
CPMO4	20,64 ab	16,40 a	0,38 a	0,38 a	0,93 ab	1,31 a
BM24	20,60 ab	16,20 a	0,37 ab	0,38 a	0,96 ab	1,35 a
BM17	19,44 ab	15,00 ab	0,36 ab	0,37 ab	0,88 ab	1,26 a
ACT05	19,14 ab	15,60 ab	0,38 a	0,39 a	0,87 ab	1,26 a
CPMO3	18,94 ab	15,40 ab	0,35 ab	0,33 ab	0,52 bc	0,86 ab
CPMO5	18,88 ab	15,80 ab	0,35 ab	0,26 ab	0,76 abc	1,02 ab
ACT01	18,80 ab	14,20 ab	0,36 ab	0,29 ab	0,76 abc	1,05 ab
ACT15	18,56 ab	14,40 ab	0,39 a	0,32 ab	0,89 ab	1,22 a
BM05	18,34 ab	13,80 ab	0,36 ab	0,34 ab	0,83 ab	1,17 a
BM01	18,10 ab	14,60 ab	0,35 ab	0,38 a	0,83 ab	1,21 a
CPMO2	17,94 ab	15,00 ab	0,35 ab	0,34 ab	0,52 bc	0,87 ab
BL06	17,80 ab	14,20 ab	0,38 a	0,40 a	0,81 ab	1,22 a
CPMO6	17,72 ab	14,60 ab	0,37 ab	0,32 ab	0,71 abc	1,03 ab
ACT11	17,44 ab	14,80 ab	0,35 ab	0,34 ab	0,80 ab	1,14 a
BL16	15,58 bc	13,20 ab	0,34 ab	0,28 ab	0,65 abc	0,93 ab
Mix ⁽²⁾	15,28 bc	13,40 ab	0,37 ab	0,38 a	0,63 abc	1,02 ab
Controle	11,90 c	12,00 b	0,29 b	0,14 b	0,38 c	0,53 b
CV%	13,26	11,47	10,09	17,81	13,30	13,73

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). *Dados transformados \sqrt{x} , ⁽²⁾ misturas de bactérias (BM24, BL06 e ACT05)

Para a tangerina Sunki pode se observar, pelos dados apresentados na Tabela 5, que somente dois isolados BM17 e BM05 mostraram capacidade em aumentar a altura das plantas. Tais isolados proporcionaram porcentagens de crescimento das plantas que variaram de 34 a 33 % em relação ao controle. Para o parâmetro referente ao número de folhas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao controle. Somente os isolados BM17 e ACT11 proporcionaram aumento do diâmetro do caule em 31% diferindo estatisticamente do controle. Quanto à massa seca da raiz e da parte aérea observa-se que, nenhum isolado foi capaz de promover aumento

significativo desses parâmetros em relação ao controle. Já quando se analisou o peso seco total, pode se observar que o isolado ACT11 diferiu estatisticamente do controle, aumentando o volume de massa seca total em 64%, porém, não diferiu dos demais tratamentos.

Tabela 5 – Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e massa seca total, de porta-enxerto tangerina Sunki, sob influência de isolados bacterianos.

Tratamento	Altura (cm)	Nº Folhas	Diâmetro Caule (cm)	Massa seca (g)		
				Raiz*	Parte aérea*	Total*
BM17	17,18 a ⁽¹⁾	19,00 a	0,29 a	0,30 a	0,83 a	1,13 ab
BM05	17,10 a	17,80 a	0,26 ab	0,22 a	0,69 a	0,92 ab
BM01	17,00 ab	17,40 a	0,27 ab	0,25 a	0,75 a	1,01 ab
ACT11	16,70 ab	19,00 a	0,29 a	0,22 a	0,81 a	1,15 a
ACT01	16,50 ab	18,20 a	0,26 ab	0,28 a	0,79 a	1,08 ab
ACT15	16,16 ab	18,80 a	0,25 ab	0,23 a	0,68 a	0,92 ab
BL06	16,16 ab	18,80 a	0,25 ab	0,23 a	0,68 a	0,92 ab
CPMO6	15,96 ab	18,40 a	0,24 ab	0,22 a	0,70 a	0,93 ab
BM16	15,96 ab	16,80 a	0,26 ab	0,19 a	0,82 a	1,02 ab
CPMO5	15,80 ab	18,00 a	0,24 ab	0,21 a	0,72 a	0,93 ab
Mix ⁽²⁾	15,58 ab	19,40 a	0,26 ab	0,29 a	0,66 a	0,96 ab
BL16	15,28 ab	19,00 a	0,25 ab	0,23 a	0,63 a	0,86 ab
BM24	15,02 ab	17,20 a	0,27 ab	0,24 a	0,71 a	0,95 ab
CPMO3	14,88 ab	17,40 a	0,25 ab	0,21 a	0,74 a	0,95 ab
ACT05	14,48 ab	16,60 a	0,24 ab	0,20 a	0,63 a	0,83 ab
CPMO4	14,40 ab	17,20 a	0,23 ab	0,20 a	0,57 a	0,78 ab
CPMO2	14,34 ab	18,00 a	0,27 ab	0,25 a	0,61 a	0,87 ab
Controle	12,80 b	16,40 a	0,22 b	0,18 a	0,51 a	0,70 b
CV%	11,78	13,77	10,59	14,45	10,49	10,88

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). *Dados transformados \sqrt{x} , ⁽²⁾ misturas de bactérias (BM24, BL06 e ACT05).

Para o porta-enxerto limão Cravo, os dados apresentados na Tabela 6 mostram que existem diferenças entre os tratamentos em relação à altura das plantas, sendo os maiores comprimentos obtidos quando as plântulas foram

tratadas com os isolados ACT01, BM05, CPMO3, ACT05, ACT15, BL16 e BM17, diferindo significativamente do tratamento controle. Com relação ao parâmetro referente ao número de folhas, somente o isolado BM05 foi capaz de promover um aumento em torno de 33% em relação ao controle. Para os demais parâmetros avaliados nenhum dos isolados testados foi capaz de promover o crescimento das plantas.

TABELA 6 - Altura, número de folhas, diâmetro do caule, massa seca da raiz e parte aérea da planta e massa seca total de porta-enxerto limão Cravo, sob influência de isolados bacterianos.

Tratamento	Altura (cm)	N° folhas	Diâmetro caule (cm)	Massa seca (g)		
				Raiz*	Parte aérea*	Total*
ACT01	20,94a ⁽¹⁾	14,40 ab	0,32 a	0,37 a	0,88 a	1,26 a
BM05	20,28 a	15,20 a	0,33 a	0,36 a	0,86 a	1,22 a
CPMO3	19,66 a	13,20 ab	0,36 a	0,35 a	0,83 a	1,19 a
ACT05	19,62 a	14,00 ab	0,32 a	0,32 a	0,72 a	1,04 a
ACT15	19,60 a	13,60 ab	0,34 a	0,36 a	0,82 a	1,18 a
BL16	19,54 a	14,00 ab	0,32 a	0,36 a	0,83 a	1,19 a
BM17	19,22 a	14,20 ab	0,32 a	0,28 a	0,74 a	1,03 a
BL06	19,12 ab	14,20 ab	0,30 a	0,27 a	0,70 a	0,98 a
CPMO4	19,08 ab	13,60 ab	0,33 a	0,34 a	0,74 a	1,09 a
BM24	18,40 ab	13,40 ab	0,33 a	0,33 a	0,81 a	1,14 a
BM01	18,32 ab	12,40 ab	0,33 a	0,35 a	0,77 a	1,12 a
Mix ⁽²⁾	18,30 ab	12,60 ab	0,33 a	0,36 a	0,73 a	1,10 a
ACT11	17,84 ab	13,00 ab	0,32 a	0,27 a	0,75 a	1,02 a
CPMO5	17,60 ab	12,60 ab	0,34 a	0,32 a	0,73 a	1,05 a
CPMO2	17,50 ab	12,60 ab	0,30 a	0,29 a	0,69 a	0,99 a
BM16	17,34 ab	12,80 ab	0,34 a	0,35 a	0,75 a	1,10 a
CPMO6	17,28 ab	12,80 ab	0,32 a	0,28 a	0,70 a	0,98 a
Controle	14,50 b	11,40 b	0,31 a	0,26 a	0,60 a	0,86 a
CV%	11,07	11,10	10,20	12,73	10,06	10,42

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). *Dados transformados \sqrt{x} , ⁽²⁾ misturas de bactérias (BM24, BL06 e ACT05).

5 DISCUSSÃO

O ensaio realizado com brotos de alfafa permitiu avaliar o potencial das bactérias testadas em diminuir estruturas reprodutivas e vegetativas de *P. nicotianae*. Quando se compara o grupo de bactérias verifica-se que 82% dos isolados de actinobactérias e de *Bacillus* spp. reduziram a quantidade de micélios, enquanto que as bactérias lácticas não inibiram a formação dessas estruturas. Por outro lado, todos os isolados deste último grupo foram capazes de diminuir o número de esporângios e, dentre esses os isolados BL16, BL06, BL12 e BL14 apresentaram 100% de inibição. Esses resultados corroboram com Leoni e Guini (2003), onde ao avaliarem isolados de fungos, actinomicetos e bactérias, verificaram que alguns isolados não permitiram a formação de esporângio e, ou micélio de *P. nicotianae*. Os autores observaram, também, que alguns micro-organismos permitiram o desenvolvimento de micélio, mas não dos esporângios, como o que aconteceu com o grupo das bactérias lácticas, no respectivo trabalho.

Quando se avaliou a microbiolização das sementes e do substrato com os diferentes isolados bacterianos, verificou-se que os isolados de bactéria láctica BL06 e BL12 apresentaram controle, com sobrevivência das plantas acima de 80%, para as duas variedades de porta-enxertos estudadas. É interessante mencionar que esses dois micro-organismos foram capazes de inibir em 100% a formação de esporângios, quando avaliados no bioensaio de alfafa, embora não tenham reduzido a formação de micélios. De acordo com Feichtenberger et al. (1997), durante o período chuvoso, uma nova geração de esporângios pode ser produzida em menos de 24 horas, portanto, o ciclo de produção de esporângios pode ser repetido muitas vezes durante o ano. Essas estruturas podem germinar diretamente ou, indiretamente, produzindo os zoósporos que na presença de água livre são liberados, atingindo as superfícies de raízes ou outros órgãos de plantas cítricas. Um agente antagonista que apresente a capacidade de diminuir estruturas infectivas do fitopatógeno, diminuindo a produção de inóculo inicial, poderá agir na

supressão da doença com muito mais eficiência, como o que foi apresentado neste trabalho.

Resultados similares foram encontrados por outros autores. Murthy et al. (2012) avaliando bactérias do ácido láctico em plantas de tomate, verificaram que cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mostraram-se bons antagonistas contra *Ralstonia solanacearum*, além de promoveram o crescimento das plantas em relação ao controle. Carrer Filho et al. (2009) avaliando a microbiolização de sementes de tomate com estirpe de *Streptomyces setonii* (UFV-RD1) observaram que o antagonista demonstrou ser capaz de inibir a germinação de conídios de *Alternaria solani*, *Stemphylium solani* e de *Corynespora cassiicola* e a germinação de esporângios de *Phytophthora infestans* nos testes *in vitro*. Os autores avaliaram a eficiência do isolado UFV-RD1 em condições de campo e observaram que o mesmo foi capaz de proteger as plantas contra *A. solani*, porém, não apresentou a mesma eficiência para o controle da requeima (*P. infestans*). Hamed et al. (2011) relataram que isolados de bactérias lácticas (provenientes de iogurte e do leite) e *L. plantarum* apresentaram atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, proporcionando um efeito protetor as plantas de tomate. Esse efeito aumentou quando as bactérias lácticas foram aplicadas como tratamento de sementes. Lutz et al. (2012) verificaram que 70% dos isolados de bactérias lácticas mostraram efeito inibitório contra *Pythium ultimum*.

Segundo Temitope e Oluchi (2015), a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas está relacionada, principalmente, à produção de uma grande variedade de metabólitos antagônicos ativos, dentre esses os ácidos orgânicos, compostos antagônicos, como dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas etc.

Nosso trabalho mostrou, também, que alguns isolados microbianos foram eficientes no controle do patógeno quando aplicados em determinada variedade de porta-enxerto de citros, independente do método de aplicação. O isolado de *Bacillus* sp. CPMO5 apresentou 92% e 83% de plantas sobreviventes de tangerina Sunki, quando aplicado na semente e no substrato,

respectivamente. Por outro lado, o isolado de actinobactéria ACT10 apresentou 92% de sobrevivência de plantas, quando aplicado no substrato de plantas de limão Cravo. Neste contexto, Rudrappa et al., (2008) demonstraram em seus estudos, que uma planta, após ser infectada por um patógeno, pode selecionar micro-organismos colonizadores específicos na rizosfera por meio da exsudação radicular. Os autores ao inocularem uma cepa patogênica de *Pseudomonas syringae* em folhas de *Arabidopsis thalianae*, verificaram um aumento na exsudação de ácido málico na rizosfera, atraindo assim, uma estirpe de *B. subtilis*, o qual formou biofilme no sistema radicular protegendo a planta contra o ataque do fitopatógeno. Essa capacidade das plantas em selecionar micro-organismos benéficos ressalta a importância da interação planta-micro-organismos, como o observado pelos resultados obtidos neste estudo.

Para a realização dos experimentos de promoção de crescimento em porta-enxerto citrico, inicialmente, no presente estudo, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação de produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de N por 30 isolados bacterianos. Posteriormente, os melhores isolados obtidos pelos resultados *in vitro* foram avaliados *in vivo* como agentes promotores de crescimento em três porta-enxertos de citros.

O estudo mostrou que a produção de AIA foi verificada na maioria dos isolados bacterianos, sendo as maiores produções obtidas em cada grupo pelo BM24 (*Bacillus* sp.), ACT15 (actinobactéria) e BL12 (bactéria láctica). Resultados similares foram obtidos por outros autores. Moreira e Araújo (2013) ao estudarem possíveis agentes promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*, verificaram que isolados de *Bacillus* spp. foram grandes produtores de auxinas. Khamna et al. (2010) relataram que dentre os isolados de actinobactérias estudados apenas 11,2% apresentaram capacidade para produzir AIA, enquanto que, Mohite (2013), analisando a produção de AIA pelas bactérias do solo rizosférico, verificou que as bactérias lácticas *Lactobacillus casei* e *L. acidophilus* foram positivas para a produção deste fitohormônio.

Com relação à solubilização de fosfato, os melhores isolados foram CPMO6 e BM17 (*Bacillus* spp.), ACT01 e ACT07 (actinobactérias) e BL06 (bactéria láctica). Estes resultados corroboram parcialmente com os obtidos por Zlotnikov et al. (2013) que ao avaliarem a solubilização de fosfato por bactérias lácticas verificaram que dos quinze isolados estudados, todos foram capazes de solubilizar fosfato insolúvel em meio de cultura sólido. Viruel et al. (2014) ao avaliarem bactérias solubilizadoras de fosfato, *Serratia marcescens*, *Pantoea eucalypti* EV1, *Pantoea agglomerans*, *P. eucalypti* EV4, *Pseudomonas tolaasii*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas koreensis*, em plantas de milho (*Zea mays* L.) em casa-de-vegetação, verificaram que todas as cepas apresentaram um efeito positivo sobre o crescimento das plantas.

Os isolados que mais fixaram N dentro de cada grupo de bactérias estudado, no respectivo trabalho, foram BM17, ACT11 e BL24. Resultados similares foram relatados por Kuss et al., (2007) que ao analisarem a fixação biológica de N *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas verificaram grande variação no comportamento dos micro-organismos quanto à fixação de N total em meio de cultura. Fernandes et al., (2001) quando analisaram a fixação biológica por bactérias diazotróficas, associadas a plantas de coqueiros, encontraram, também, variações no comportamento desses micro-organismos quanto à fixação de N *in vitro*.

Quando se observam os dados *in vivo* para o porta-enxerto citrumelo Swingle, verifica-se que, os isolados de *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4 foram eficientes para o desenvolvimento das plantas em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4). Em um trabalho realizado por Araujo e Guerreiro (2010) em que se avaliou o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Bacillus* spp. em sementes de milho, os autores observaram que os isolados apresentaram efeito significativo sobre as variáveis número de folhas e biomassa seca total. Segundo os autores, a maioria dos isolados que promoveu crescimento do milho não estava entre os maiores produtores de AIA em laboratório. No entanto, os isolados BM16 e CPMO4 embora tenham produzido AIA e fixado N, *in vitro*, os mesmos não se encontram entre os melhores produtores deste fito hormônio. Segundo Han e New (1998) a fixação biológica de N em meio de

cultura semissólido não foi correlacionada com a fixação de N em campo, conforme os dados obtidos em seus experimentos. Resultados semelhantes foram relatados por Mehnaz e Lazarovits (2006). Segundo os autores, em estudos com isolados bacterianos produtores de AIA, foi verificado que o isolado que expressou maior produção de AIA não foi o que promoveu o maior crescimento das plantas de milho, porém, os autores afirmaram que a produção do fito hormônio foi o principal mecanismo envolvido na promoção de crescimento. Neste aspecto, Dobbelaere et al. (2002) relataram que a capacidade dos micro-organismos produzirem altas taxas de AIA *in vitro* não é um pré-requisito para que ocorra aumento do crescimento das plantas, pois, segundo os autores, o efeito benéfico depende da concentração utilizada. Tal substância em baixas concentrações pode estimular o crescimento das raízes, porém, quando, em concentrações mais altas, podem causar efeito inibitório no crescimento vegetal. No entanto, a capacidade do micro-organismo para produzir altas taxas de IAA não garante que o mesmo seja, também, um bom agente promotor de crescimento de plantas, como observado no respectivo trabalho.

É importante mencionar que os tratamentos com os isolados BM24, ACT05 e BL06 praticamente promoveram o crescimento do porta-enxerto citrumelo Swingle, com exceção de apenas um parâmetro dentre todos, dependendo do isolado. No entanto, quando esses isolados foram usados em mistura, somente mostraram eficiência em um único parâmetro avaliado, que correspondeu à massa seca da raiz. O fato da mistura dos isolados não ter proporcionado aumento no crescimento das plantas de citrumelo Swingle, pode ser devido a três fatores, primeiro, pelos diferentes modos de ação das bactérias envolvidas (RAUPACH e KLOEPPER, 1998), segundo, pela existência de competição entre os micro-organismos da mistura (HIBBING et al., 2010) e, em terceiro, pelo fato da combinação dos isolados não ter sido a mais adequada. Uma combinação onde houvesse sinergismo entre isolados, possivelmente, o resultado seria mais promissor em termos de promoção de crescimento das plantas.

Em contrapartida, em plantas de tangerina Sunki, o melhor tratamento foi obtido com BM17 que proporcionou aumento na altura e no diâmetro do caule das plantas. Quando se observa os dados *in vitro* verifica-se que esse isolado de *Bacillus* spp. produziu AIA, solubilizou fosfato e fixou N (figuras 3, 4 e 5). É importante mencionar que, embora o isolado de actinobactéria ACT11 não tenha proporcionado crescimento da planta pela maioria dos parâmetros avaliados, este promoveu aumentos de 31% e 64%, no diâmetro do caule e na massa seca total, respectivamente, em relação aos tratamentos controles. Fato semelhante foi também observado por Freitas e Aguilar Vildoso (2004) que relataram que 8% das bactérias do gênero *Bacillus*, inoculadas em plântulas de citros, não tiveram efeito no crescimento da parte aérea das plantas, mas, sim, sobre a matéria seca da raiz.

Em muitos casos as bactérias promotoras de crescimento quando são aplicadas a campo não alcançam os efeitos desejados, esse fato pode estar associado à insuficiente colonização da rizosfera pelos micro-organismos. De acordo com Compant et al. (2010) a colonização na rizosfera de uma estirpe bacteriana é um dos requisitos indispensável para se ter sucesso na promoção de crescimento das plantas.

Com relação aos dados de limão Cravo, dentre os parâmetros avaliados, os únicos que foram capazes de mostrar diferenças entre os tratamentos foram a altura e o número de folhas. Os melhores resultados foram obtidos com aplicações dos isolados de *Bacillus* spp. BM05, BM17 e CPMO3, actinobactérias ACT01, ACT05 e ACT15 e, com a bactéria láctica BL16, que aumentaram a altura das plantas. O isolado BM05 foi o único que aumentou, significativamente, o número de folhas nas plantas avaliadas (Tabela 6).

O efeito de bactérias lácticas na promoção de crescimento de plantas cítricas foi observado em plantas de citrumelo Swingle e limão Cravo. Para o primeiro, o isolado BL06 promoveu o desenvolvimento das plantas em todos os parâmetros avaliados, com exceção ao número de folhas. Para o limão Cravo, o isolado BL16 proporcionou a maior altura das plantas. Murthy et al. (2012), avaliando bactérias do ácido láctico em plantas de tomate, verificaram que cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* e *L. paracasei* subsp.

paracasei promoveram o crescimento das plantas aumentando a matéria fresca, o comprimento da parte aérea e da raiz, em relação ao controle.

No respectivo trabalho, observou-se que a promoção de crescimento das plantas cítricas pelos diferentes micro-organismos avaliados, dependeu do genótipo da planta. Os isolados de BM16 e CPMO4 foram capazes de promover o crescimento de citrumelo Swingle. Em plantas de tangerina Sunki, os melhores resultados foram obtidos com o tratamento BM17 (*Bacillus* sp.) e ACT11 (actinobacteria). Para porta-enxerto limão Cravo, apenas BM05 (*Bacillus* sp.) foi capaz de promover aumento em dois parâmetros avaliados, sendo a altura e o número de folhas.

Relatos de literatura mostram que associações entre plantas e bactérias podem envolver interações específicas (BENIZRI et al., 2001) e, que diferenças de composição dos exsudatos de raízes podem influenciar a colonização dos micro-organismos na rizosfera (LUGTENBERG et al., 2001), podendo muitas vezes serem atrativos ou deletérios aos micro-organismos presentes, o que talvez possa explicar porque alguns isolados agiram melhor em um porta-enxerto e não nos demais. Segundo Spaepen et al. (2007) um dos componentes dos exsudatos radiculares que varia muito entre as espécies de plantas é o triptofano que tem sido identificado como o principal precursor da biossíntese de IAA em bactérias. Isto pode explicar a promoção de crescimento do porta-enxerto citrumelo Swingle em relação aos demais estudados.

No respectivo estudo foi observado que a habilidade para produção de AIA, solubilização de fosfato ou, fixação de N pelos micro-organismos, não necessariamente, está associada à promoção de crescimento das plantas cítricas.

Estudos futuros são necessários de modo a compreender melhor essas interações entre hospedeiro e micro-organismos benéficos, de maneira a favorecer a seleção de estirpe com potencial agrícola para aumentar a produtividade de porta-enxertos de citros, tornando-os menos suscetíveis ao estresse abiótico e às doenças.

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- a) Os isolados de bactéria láctica BL06 e BL12 apresentam potencial como agentes de biocontrole de *Phytophthora nicotianae*; independente do método de aplicação utilizado (microbiolização de sementes ou de substrato);
- b) Os isolados de *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4 foram capazes de promover o crescimento do porta-enxerto Citrumelo Swingle;
- c) Para a promoção de crescimento de plantas de tangerina Sunki, os melhores resultados foram obtidos com BM17 (*Bacillus* sp.) e ACT11 (actinobacteria);
- d) Para o porta-enxerto limão Cravo, apenas BM05 (*Bacillus* sp.) foi capaz de promover aumento da altura e do número de folhas.

7 LITERATURA CITADA

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p. 173-181, 2008.

ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v.36, p. 135-140, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aa/v36n2/v36n2a01.pdf> >. Acesso em abr. de 2015.

ALTIERI, M. A. **Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa**. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989.

ALTIERI, M. A. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Revista NERA**, Ano 13, n.16, p. 22-32, 2010.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p. 565-568, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v24n2/a58v24n2.pdf>>. Acesso em jul. 2015.

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p. 134-136, 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452003000100038&script=sci_arttext > Acesso em jul. 2015.

ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e agrotecnologia**, vol.34, p. 837-844, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1413-70542010000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. > Acessado em maio 2015.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting

activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p. 231-237, 2002.

AULER, P. A. M.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; TAZIMA, Z. H. Comportamento da laranjeira 'Valência' sobre seis porta-enxertos no noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p. 229-234, 2008.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p. 557-574, 2001.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: _____. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 1, p. 7-14.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogenfixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: projects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p. 199-209, 2008.

BRASHEARS, M. M.; JARONI, D.; TRIMBLE, J. Isolation, selection and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Eschericia coli* 0157:H7 in cattle. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 355-363, 2003.

BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O. D. F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, p. 310-317, 2014.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência e Tecnologia** - Embrapa, v.18, p. 69-101, 2001.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L. S.; GARCIA, F. A. O. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**, v.27, p. 340-344, 2009.

CHEN, M-H.; JACK, A. H.; MCGUIRE, I. C.; NELSON, E. B. Seedcolonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. **Phytopathology**, v.102, p. 478-489, 2012.

COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p. 1413-1420, 2007.

COLLAVINO, M.M.; SANSBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A.; AGUILAR, O.M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p. 727-738, 2010.

COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p. 669-678, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira de laranja.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_38_01_boletim_laranja__1_2013.pdf>. Acesso em: 30 out. 2015.

ÇADIRCI, B. H.; ÇITAK, S. A. Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.4, p. 237-241, 2005.

DECARLOS NETO, A.; SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, P. R. G.; VENEGAS, V. H. A. Crescimento de porta-enxertos de citros produzidos em tubetes e

influenciados por doses de N. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p. 199-203, 2002.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertil of Soils**, v.36, p. 284-297, 2002.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.

EL-MABROK, A. S. W.; ZAITON, H.; MOKHTAR, A. M.; AWEEN, M. M. A. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* C5 cell and their supernatant against *Colletotrichum gloeosporioides* on germination rate of chilli seeds. **Research Journal of Biological Sciences**, v.7, p. 159-164, 2012.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.; GUIRARDO, N. Doenças dos citros. In: Kimati, K. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo. Agronomica Ceres, 1997. 774p.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E. D. M. N. et al. (Eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas, SP: Livraria Rural, 2001. p.283-342.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE, J. R. J. Doenças dos Citros. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, vol.2. São Paulo: Editora Ceres. 2005. p.239-269.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região da baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p. 1509-1517, 2001. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-204x2001001200008&script=sci_arttext>. Acessado em: 15 de ago. de 2015.

FERNANDES, A. O. **Bactérias endofíticas e fungo micorrízico arbuscular na produção de mudas cítricas**. 2012. 67 fls. Dissertação (mestrado) - Instituto Agronomico de Campinas – IAC, Campinas, 2012.

FERREIRA, D. F. **Manual do Sistema SISVAR para análises estatísticas**. Universidade Federal de Lavras, 2000. 66 p.

FNP Consultoria e Comercio. Citros Laranja. In:_____. Agrianual 2014: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP 2014.

FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, v.28, p. 989-994, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010006832004000600007>. Acesso em: 30 abr. 2015

FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. 198 p.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 653 p.

GRAF, C. C. D. Vivecitrus e a produção de mudas certificadas. **Laranja**, v.22, p. 533-548, 2001.

GRAHAM, J. H. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. **Plant Disease**, v.74, p. 743-746, 1990.

GRAHAM, J.; FEICHTENBERGER, E. Citrus phytophthora diseases: Management challenges and successes. **Journal of Citrus Pathology**, v.2, p. 1-11 2015. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/3db485rh#page-1>> Acesso em: 13 jan. 2016.

GRAHAM, J. H. Phosphite for control of *Phytophthora* diseases in citrus: model for management of *Phytophthora* species on forest trees? **New Zealand Journal of Forestry Science**, v.41, p. 49-56, 2011.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, v.37, p. 395-412, 2005.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **In: Floresta**, v.30, p. 155-165, 2000.

HAMED, H. A.; MOUSTAFA Y. A.; Y ABDEL - AZIZ, S. M. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusariumoxysporum* for protection of tomato plant. **Life Science Journal**. v. 8, n. 4, p. 462 - 468. 2011

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v.36, p. 193-201, 1998.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, p. 343-357. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672004000300002. Acesso em: 20 de jul. 2015.

HARMAN, G.E.; OBREGON, M.A.; SAMUELS, G.J.; LORITO, M. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. **Plant Disease**, v.8, p.928-939, 2010.

HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 15-25, 2010.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsia Journal of BioSciences**, v.4, p. 23-32, 2010.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, in: Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos

Technology, edited by: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. Springer International Publishing, Switzerland; 2014. p. 31-62.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v.94, p. 1259–1266, 2004.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, p. 1459-1465, 2007.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: de MATOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. 929 p.

LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 67-75, 2003.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 2, p.15-28.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p. 461-490, 2001.

LUTZ, M. P.; MICHEL, V.; MARTINEZ, C.; CAMPS, C. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. **Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens**, v.78, p. 285–288, 2012.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**, v.1, p. 33-77, 1993.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**, 2ª ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R. T.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 534-540, 2003.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R. T. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 169-178, 2004.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, p. 326-335, 2006.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, vol.13, p. 638-649, 2013.

MOREIRA, A.L. L.; ARAÚJO, F, F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de rescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, v.37, p. 933-943, 2013. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622013000500016&script=sci_arttext. Acessado em: 01 maio 2015.

MORETTO, K. C. K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos, causada por *Colletotrichum acutatum***. 2000. 130 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

MURTHY, K. N.; MALINI, M.; SAVITHA, J.; SRINIVAS, C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. **Pest Management In Horticultural Ecosystems**, v.18, p. 60-65, 2012.

NEHL, D. B.; ALLEM, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p. 1-20, 1997.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Independente, v.1, 137 p., 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf>. Acesso em: 05 maio. 2014.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiological**, v.42, p. 207–220, 1996.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic Acid in development of the Host Plant Root System. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 3795–3801, 2002.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v.28, p. 112-121, 2012.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: de MATOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. 929 p.

PRADO, R. M.; ROZANE, D. E.; CAMAROTTI, G. S.; CORREIA, M. A. R.; NATALE, W.; BARBOSA, J. C.; BEUTLER, A. N. Nitrogênio, Fósforo e Potássio na nutrição e na produção de mudas de laranjeira ‘valência’, enxertada sobre citrumeleiro ‘swingle’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p. 812-817, 2008.

RAUPACH, G. S.; KLOPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p. 1158-64, 1998.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J-M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p. 305–339, 2009. Disponível em: <http://www.planta.cn/forum/files_planta/13_204.pdf>. Acesso em 08. abr. 2015.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 319–339, 1999.

RODRÍGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v.84, p. 155-161, 2000.

ROSENZWEIG, C.; HILLEL, D. Climate Variability and the Global Harvest: **Impacts of El Nino and Other Oscillations on Agroecosystems** (Oxford Univ Press, New York). 2008. 280 p.

ROZANE, D. E.; PRADO, R. M.; NATALE, W.; BEUTLER, A. N.; SILVA, S. R.; BARBOSA, J. C. Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio na nutrição e na produção do porta-enxerto de limoeiro cravo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.31, p. 255-260, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86212009000200011&script=sci_arttext>. Acesso em: 06 de set. 2015.

RUDRAPPA, T.; CZYMMEK, K. J.; PARÉ, P. W.; BAIS, H. P. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v.148, p. 1547-1556, 2008.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, v.31, p. 723-733, 2001.

SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P. de.; MORALES, C. F. G.; RADMANN, E. B. Adubação nitrogenada na formação de porta-enxertos de limoeiro 'cravo' em tubetes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p. 131-135, 2004.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p. 311-319, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v24n2/08.pdf>. >. Acesso em: 22 de ago. 2015.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p. 749-754, 2008.

SIVIERO, A.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros. **Laranja**, v.23, p. 203-219, 2002.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; FURTADO, E. L.; GARCIA, A. A. F.; COELHO, A. S. G.; MACHADO, M. A. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora* gummosis. **Journal of applied genetics**, v.47, p. 23-28, 2006.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉIA, M. M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**. Jaguariúna: (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42), 2004. 29 p.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p. 425-48, 2007.

TEMITOPE, F. P.; OLUCHI, U. E. Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit. **Journal of Microbiology Research**, v.5, p. 95-100, 2015.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; et al. Influência de onze porta-enxertos na produção e qualidade dos frutos da laranjeira 'Pêra', clone Bianchi. **Laranja**, v.20, p. 153-166, 1999.

VALE, D. W. do.; PRADO, R. de M.; SOUZA, H. A. de.; MARTINS, A. B. G. Doses de nitrogênio, fósforo e potássio na nutrição do porta-enxerto cítrico de limoeiro 'Cravo'. **Scientia Agrária**, v.10, p. 61-66, 2009.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p. 127-141, 2001.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p. 1-10, 2008.

VIRUEL, E.; ERAZZÚ, L. E.; MARTÍNEZ CALSINA, L.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E.; SIÑERIZ, F. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. **Journal of Soil Science Plant Nutrition**, v.14, p. 819–831, 2014.

ZLOTNIKOV, K. M.; ZLOTNIKOV, A. K.; KAPARULLINA, E. N.; DORONINA, N. V. Phylogenetic Position and Phosphate Solubilization Activity of Lactic Acid Bacteria Associated with Different Plants. **Microbiology**, v.82, p. 393–396, 2013.

WANG, Y.; WANG, E.; WANG, D.; HUANG, S.; MA, Y.; SMITH, C.J.; WANG, L. Crop productivity and nutrient use efficiency as affected by long-term fertilisation in North China Plain. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.86, p. 105-119, 2010.