

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURTIBANOS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS RURAIS**

BRUNA ORSI

**AVALIAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE
ALHO E NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*.**

CURITIBANOS

2013

BRUNA ORSI

AVALIAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM ALHO E NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*.

Projeto apresentado como exigência para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Rurais, do curso de Ciências Rurais, ministrado pela Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, sob a orientação dos professores Glória Regina Botelho, Mônica Aparecida Aguiar dos Santos e Alexandre Tavela.

CURITIBANOS

2013

RESUMO

A cultura do alho apresenta grande importância socioeconômica no sul do país, sendo uma das espécies mais cultivadas na região do Planalto Catarinense, fonte de renda para grandes e pequenos produtores. Considerando a importância econômica do alho na região de Curitiba e os mecanismos benéficos de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente na promoção do crescimento de diversas culturas, objetiva-se neste trabalho verificar o potencial destas rizobactérias na promoção do crescimento de alho e no controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*, fungo causador da podridão seca. Serão realizadas diluições seriadas de amostras de solo rizosférico de alho para obter os isolados de *Pseudomonas*, que serão submetidos ao teste de Gram e estocados em criotubos. Serão realizadas avaliações *in vivo* e *in vitro* da promoção de crescimento dos isolados obtidos. Para a promoção de crescimento *in vitro* os isolados serão submetidos a testes de solubilização de fosfatos em meio específico e produção de ácido-indol-acético em meio TSA. A avaliação do controle biológico de *F. oxysporum* será realizada em meio BDA, onde quatro isolados de *Pseudomonas* serão inoculados em placa de Petri com o isolado do fungo. A avaliação terá caráter qualitativo, observando-se a presença de halo de inibição. Para a promoção do crescimento *in vivo* serão testados os isolados que promoverem a solubilização de fosfatos ou produzirem AIA. O experimento se dará em casa de vegetação, onde bulbilhos de alho inoculados com suspensão bacteriana dos isolados serão semeados em vasos de 5L contendo substrato, com fornecimento de nutrientes através de soluções nutritivas. Serão avaliados os parâmetros, estatura da parte aérea, número de folhas, estatura radicular, tamanho comercial dos bulbilhos e peso dos bulbilhos. Serão cinco repetições, um tratamento testemunha e a análise estatística será submetida a variância e ao teste de Dunnett e Scott Knot, com 5% de significância. Espera-se observar diferença de crescimento entre os bulbilhos que serão inoculados com *Pseudomonas* e os que não receberão a suspensão celular. Além disso, espera-se verificar antagonismo de *Pseudomonas* spp. em relação ao fungo *F. oxysporum* f. sp. *Cepae*, causador da podridão seca em alho.

Palavras-Chave: Rizobactérias, podridão seca, *Allium sativum*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. JUSTIFICATIVA	5
3. HIPÓTESES	6
4. OBJETIVOS	7
4.1. Objetivo Geral	7
4.2. Objetivos Específicos	7
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
5.1. A cultura do alho	8
5.2. Rizobactérias na promoção do crescimento de plantas	9
5.3. Patogenicidade de <i>F. oxysporum f. sp. cepae</i>	11
6. METODOLOGIA	13
6.1. Local do experimento	13
6.2. Obtenção dos isolados de <i>Pseudomonas spp.</i>	13
6.3. Avaliação do potencial de promoção de crescimento <i>in vitro</i>	14
6.4. Avaliação do potencial de controle biológico <i>in vitro</i> à <i>Fusarium spp.</i>	15
6.5. Teste de promoção de crescimento <i>in vivo</i>	15
7. RESULTADOS ESPERADOS	17
8. CRONOGRAMA	18
9. ORÇAMENTO	19
10. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O alho é uma das culturas cuja importância econômica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em 2012 o Brasil cultivou uma extensão de área 11.208 hectares, com uma consequente produção de 108.805 toneladas de alho (IBGE, 2013b). Atualmente o país é o segundo maior consumidor e o maior importador de alho do mundo. (SOUZA; MACEDO, 2009). Na região de Curitiba a produção desta cultura no ano de 2012 foi de 8.000 toneladas, caracterizando-se como a maior produtora de alho de Santa Catarina neste mesmo ano (IBGE, 2013a). Inúmeras doenças atacam a cultura no Brasil, sendo a falta de variedades resistentes um agravamento para a severidade das doenças (LUCINI, 2009). A fusariose ou podridão basal, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Cepae*, é uma doença comum na cultura do alho, possuindo maior severidade em solos onde se pratica seu cultivo sucessivo. Esta doença caracteriza-se pela presença de mofo branco e mofo nos bulbos. A aplicação foliar de fungicidas para esta doença é ineficiente na cultura do alho, uma vez que o alvo não é atingido, em função do pseudocaule (LUCINI, 2004).

A preocupação em relação aos efeitos nocivos de produtos químicos têm resultado no aumento de pesquisas voltadas a novas tecnologias, como as rizobactérias. O setor produtivo tem dado enfoque em tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola que minimizem os efeitos danosos de produtos químicos (CHAIM; ROSA; VALARINI, 1999).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) habitam a rizosfera e podem beneficiar o crescimento de espécies vegetais. Estes microrganismos são estimulados pelos exsudatos radiculares e podem atuar na promoção do crescimento de forma direta ou indireta (FREITAS et al., 2004; VOISARD et al., 1994). Estas rizobactérias previnem o estabelecimento de patógenos na rizosfera por produzirem antibióticos, sideróforos ou enzimas hidrolíticas (BETTIOL, 1995; SILVA, 2011). As rizobactérias do gênero *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente têm recebido atenção devido a sua capacidade em produzir sideróforos e suprimir a atividade de fitopatógenos do solo (LOPER; BUYER, 1991; VOISARD, et al., 1994).

Considerando a importância econômica do alho na região de Curitiba e os mecanismos benéficos de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente na promoção do crescimento de diversas culturas, objetiva-se neste trabalho verificar o potencial destas rizobactérias na promoção do crescimento de alho e no controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum f. sp. Cepae*, fungo causador da podridão seca.

2. JUSTIFICATIVA

A cultura do alho apresenta grande importância socioeconômica no sul do país, sendo uma das espécies mais cultivadas na região, fonte de renda para grandes e pequenos produtores.

As rizobactérias do gênero *Pseudomonas* tem sido amplamente estudadas em virtude de seu potencial relacionado à promoção de crescimento de plantas e ao controle biológico de patógenos em diversas culturas. O uso de RPCPs inoculados a sementes mostra-se uma alternativa eficaz na diminuição de custos com insumos agrícolas e no consequente aumento da produtividade. Sendo assim, faz-se necessário conhecer o potencial destas bactérias em relação ao alho, como já feito para outras culturas.

Visto ainda os impactos ambientais que levam ao desequilíbrio natural do agroecossistema, causados pelo uso de insumos químicos na agricultura, enfatiza-se a importância da produção de inoculantes baseados na versatilidade de RPCPs. Além disso, o difícil controle de patógenos de solo inviabiliza o uso de insumos químicos, como no caso da podridão seca do alho, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Cepae* onde o controle com fungicidas foliares não é eficiente, e as perdas causadas na produção de alho e cebola são bastante expressivas.

Desta forma, o uso de inoculantes pode levar a um aumento na produtividade, tornar o produto diferenciado e assim elevar sua competitividade no mercado e diminuir os custos para o produtor.

3. HIPÓTESES

- As rizobactérias do gênero *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente promovem o crescimento de alho (*Allium sativum*) de forma direta, através da solubilização de fosfatos e da produção de ácido-indol-acético.
- A promoção do crescimento de alho através de *Pseudomonas* spp. pode ser observada em condições *in vivo*, em ambiente protegido.
- Os isolados de *Pseudomonas* spp. são eficientes no controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, fungo causador da podridão seca em alho.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Verificar o potencial de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente na promoção do crescimento de alho e no controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*.

4.2. Objetivos Específicos

- Isolamento de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente da rizosfera de alho.
- Avaliação *in vivo* e *in vitro* do potencial dos isolados de *Pseudomonas* spp. na promoção de crescimento em alho.
- Avaliação do potencial de *Pseudomonas* spp. no controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. A cultura do alho

O alho (*Allium sativum*) é uma hortaliça originária da Ásia Central, sendo a séculos cultivada em vários países do mundo (MOURA et al., 2013; FILGUEIRA, 2007). Atualmente pertencente à família Alliaceae, embora anteriormente estivesse incluído à família Liliaceae (SOUZA; MACÊDO, 2009), o alho tem característica de uma planta herbácea, apresentando folhas longas, pontiagudas e achatadas (FILGUEIRA, 2007).

O alho possui grande importância econômica e social em Santa Catarina, estando entre as quatro principais hortaliças cultivadas no Estado, ao lado da cebola, batata e tomate (BIASI, 2006). Utilizado principalmente como condimento, embora a espécie também seja apreciada em função de seu potencial medicinal, por suas propriedades terapêuticas (FERNANDES; DUSI; RESENDE, 2013; DALONSO et al., 2009).

Segundo os dados da Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, em 2012 o plantio do alho no Estado se estendeu por uma área de 1.993 hectares, com consequente produção de 17.737 toneladas, ficando atrás apenas dos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás. Conforme dados do IBGE, em 2012 a área total plantada na região de Curitiba correspondeu a 800 hectares. Neste mesmo ano a cidade foi a maior produtora de alho em Santa Catarina, com uma produção de 8.000 toneladas (IBGE, 2013). O aumento da produtividade neste município se permitiu através do plantio do alho nobre roxo, responsável por 35% da oferta de alho no Brasil.

O ciclo do alho pode ser dividido em três fases diferentes. A primeira, refere-se ao início da brotação até o desaparecimento da folha de reserva. A segunda, compreende a emissão de folhas novas até o início da diferenciação e a terceira, refere-se ao desenvolvimento dos bulbilhos até a maturação do bulbo (LUCINI, 2004). A variedade de alho nobre Chonan é uma variedade de ciclo médio e é amplamente utilizada na região de Santa Catarina por condições edafoclimáticas, tecnológicas e comerciais (LUCINI, 2004).

Como fatores limitantes para o cultivo do alho podem ser citados o fotoperíodo e o calor, que se adequados permitem a formação de bulbos e o seu desenvolvimento, respectivamente (FILGUEIRA, 2007). Além disso, a escolha da semente e avaliação de sua sanidade é de grande importância para a cultura, promovendo maior produtividade ao evitar a disseminação de doenças (FERNANDES; DUSI; RESENDE, 2013). O alho é uma espécie

vegetal que não possui semente botânica verdadeira, ou seja, a produtividade é garantida pela qualidade dos bulbos (LUCINI, 2004).

5.2. Rizobactérias na promoção do crescimento de plantas

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são amplamente estudadas em virtude de seus efeitos benéficos comprovados para várias espécies. Estes microrganismos referem-se às bactérias que influenciam no crescimento de uma ou mais espécies vegetais e vivem na rizosfera (WELLER; TOMASHOW, 1994). Hiltner (1904 apud BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006, p.401) propôs o termo rizosfera, o qual definiu como sendo a zona ao redor de raízes de plantas que possui nutrientes liberados pelas raízes, as quais são colonizadas por microrganismos.

O solo em torno às raízes de plantas é modificado física e quimicamente, de forma a tornar este, um habitat propício ao desenvolvimento da comunidade microbiota (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006). As RPCPs são estimuladas pelos exsudatos radiculares e promovem o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos ao serem inoculadas nas sementes ou no solo. Os benefícios causados às plantas por intermédio de RPCPs podem ser de caráter direto ou indireto (VOISARD et al., 1994). O primeiro caso é consequência da solubilização de nutrientes do solo pelas RPCPs, como no caso da solubilização de fosfatos minerais (SOUCHIE; ABOUD; CAPRONI, 2007). Estas bactérias podem ainda produzir ou alterar as concentrações de hormônios vegetais, como o ácido-indol-acético (CATTELAN, 1999). A conversão de triptofano em AIA é um mecanismo realizado por várias RPCPs, por contribuir na redução do excesso deste aminoácido na rizosfera, o que pode ser deletério para as células bacterianas (BRUNETTA, 2006).

Muitas RPCPs promovem aumento no comprimento das raízes e no número de pelos radiculares através da produção de hormônios de crescimento. Outros exemplos de hormônios vegetais fornecidos por RPCPs podem ser citados, como o ácido giberélico, citocininas e etileno. Ainda outro meio de promoção do crescimento vegetal pode se dar através da fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas às plantas (CATTELAN, 1999).

A promoção de crescimento indireta relaciona-se ao controle biológico, que pode se dar através da competição por nutrientes com o patógeno (FREITAS et al., 2004; VOISARD, et al., 1994). O controle biológico também pode ocorrer através de mecanismos como a produção de antibióticos, sideróforos ou enzimas hidrolíticas (BETTIOL, 1995; SILVA, 2011). Segundo Buchenauer (1998 apud BRUNETTA, 2006, p.11) as enzimas líticas

produzidas por algumas rizobactérias podem inibir o crescimento micelial, o que impede a germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos. A produção de sideróforos, substâncias capazes de quelar o ferro na rizosfera, fazem-no indisponível para outros microrganismos, comprometendo seu desenvolvimento (BHOLAY; JADHAV; BORKHATARIA, 2012, RACHID; AHME, 2005; VOISARD, et al., 1994). A ocupação pelos sítios de infecção pelas RPCR's, e indução de resistência sistêmica também são mecanismos de supressão a patógenos (WELLER; TOMASHOW, 1994).

As RPCPs *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente são amplamente estudadas por contribuírem no crescimento de plantas e afetarem o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos por vários mecanismos, que incluem a produção de hidrocianetos, compostos voláteis e antibióticos. Dentre os antibióticos produzidos por *Pseudomonas* podem ser citados fenazina, fluoreglucionol e pioluterina (WELLER; TOMASHOW, 1994).

Este gênero de bactérias caracteriza-se por serem bastonetes gram-negativos aeróbicos e anaeróbicos em alguns casos, com um único flagelo polar pelo qual se movimentam (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estas rizobactérias quando aplicadas às sementes, pedaços de sementes ou raízes, podem proporcionar diminuição do tombamento das plantas e podridão das raízes, causando um conseqüente aumento no crescimento e produção de várias culturas (AGRIOS, 2004). Conforme Buchenauer (1998 apud BRUNETTA, 2006, p.12) os sideróforos produzidos por *Pseudomonas* são altamente eficientes na formação de quelatos de ferro, que são atraídos por membranas protéicas específicas a este gênero, o que os torna indisponíveis a outros microrganismos. Considera-se ainda o fato de sideróforos serem um dos mecanismos propostos à indução de resistência sistêmica

Segundo Bossis et al., (2000 apud BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006, p.406), dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser citadas as *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, o qual inclui *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. aeruginosa*.

Muitas destas espécies de *Pseudomonas* excretam pigmentos extracelulares e solúveis em água, que se difundem no seu próprio meio. A espécie *P. aeruginosa*, produz uma pigmentação verde-azulada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Vários trabalhos envolvendo bactérias do gênero *Pseudomonas* e promoção de crescimento já foram realizados. Relataram-se benefícios à plantas cítricas (FREITAS et al., 2004); alface (CIPRIANO, 2009; FREITAS; MELO; DONZELI, 2003); cebola (HARTHMANN et al., 2009) e pimenta (SOPHER; SUTTON 2011). A busca e estudos voltados a estes microrganismos vêm da preocupação relacionada aos efeitos nocivos que produtos químicos

fitossanitários ocasionam ao meio ambiente. Estes produtos, se não respeitados em relação as suas particularidades de uso, podem não só causar efeitos danosos ao ambiente, mas também a saúde humana (CHAIM; ROSA; VALARINI, 1999).

5.3. Patogenicidade de *F. oxysporum f. sp. cepae*

O gênero *Fusarium* abrange várias espécies que causam sérios problemas a diversas culturas em todo o mundo, sendo divididos em mais de 120 *formae specialis*, de acordo com seus hospedeiros. Estes ainda podem ser subdivididos de acordo com características fisiológicas (AGRIOS, 2004). As diversas *formae specialis* de *Fusarium* podem sobreviver no solo inclusive na ausência de hospedeiro, como forma de micélio ou de esporo, ou ainda nos tecidos de várias espécies vegetais, consideradas hospedeiros alternativos ao patógeno (BEDENDO, 2011). Durante o armazenamento, a disseminação ocorre com o contato entre bulbos sadios e doentes, sendo a temperatura entre 26-28°C favorável à doença (MASSOLA; JESUS JR; KIMATI, 2005).

Ao infectar um hospedeiro este fungo entra em contato com substâncias antimicrobianas que, através de enzimas codificadas pelos respectivos genes de cada *formae speciali* de *Fusarium*, são convertidas em substâncias não tóxicas (AGRIOS, 2004). No contato do patógeno com a raiz do hospedeiro as estruturas de resistência podem germinar, ao serem estimuladas por exsudatos produzidos pela planta, o que leva a infecção (BEDENDO, 2011). A penetração ocorre através da raiz principal, ou por radículas e pêlos absorventes e a colonização se dá com o crescimento intercelular das hifas em direção aos vasos de xilema. O desenvolvimento do fungo leva à obstrução dos vasos por conta do acúmulo de estruturas e substâncias formadas pelo patógeno, que podem inclusive serem arrastados pelo fluxo de seiva bruta. Algumas toxinas produzidas pelo fungo podem também bloquear os vasos, já que estas destroem as células ao redor dele, originando materiais que ali se acumulam, ou que atingem as folhas, reduzindo a síntese de clorofila. Além disso, ocorre o escurecimento dos vasos ocasionado por substâncias resultantes de oxidação e polimerização de compostos fenólicos, que são lançados no sistema vascular (BEDENDO, 2011).

A podridão seca é uma doença comum na cultura do alho, causada por *Fusarium oxysporum f. sp. cepae*, se desenvolvendo melhor em ambientes úmidos e quentes e em locais onde não se pratica a rotação de culturas (LUCINI, 2009). Seus sintomas são folhas amareladas, murchas e curvadas para baixo (Figura 1A). As raízes das plantas afetadas apresentam coloração marrom-escuro. Nos bulbilhos ocorre podridão basal, que caminha para

cima, destruindo os tecidos, apresentando mofo branco (Figura 1B). A entrada do fungo pode ocorrer em raízes saudáveis ou danificadas por injúrias mecânicas, ou por outros patógenos como nematoides (LUCINI, 2009; MASSOLA JR; JESUS JR; KIMATI, 2005).

Na ausência de ferro, *F.oxysporum* tem menor taxa de germinação de clamidósporos e produz tubos germinativos menores. A consequência disso é a redução da taxa de infecção. O pH também exerce influência sobre a infecção do patógeno, considerando que em situações de pH alto a disponibilidade de ferro é menor (BEDENDO; MASSOLA JR; AMORIN, 2011).

Como controles utilizados para esta doença pode-se citar o uso de bulbilhos saudáveis, tratamento químico antes do plantio, ou tratamentos culturais como a eliminação de plantas infectadas e rotação de culturas (LUCINI, 2009; MASSOLA JR; JESUS JR; KIMATI, 2005).

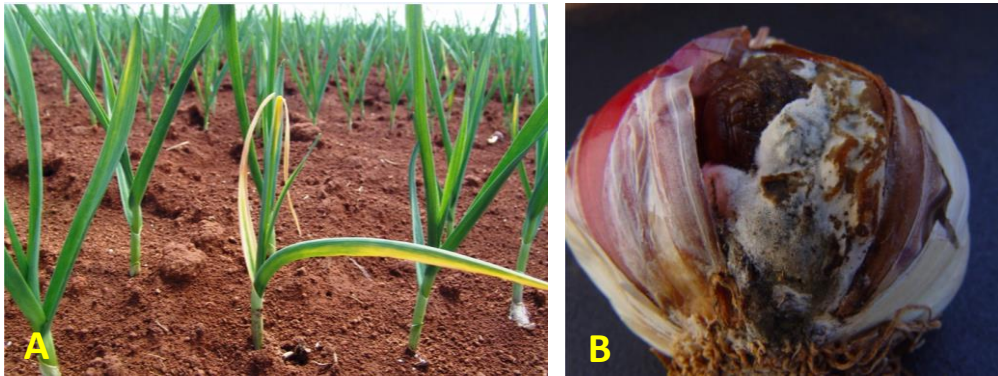


Fig.1. (A) Sintomas iniciais de *Fusarium oxysporum* caracterizados pela presença de folhas amareladas e curvadas para baixo. (B) Mofo branco em bulbo infectado. Fonte: LUCINI, 2009).

6. METODOLOGIA

6.1. Local do experimento

Este trabalho será realizado no laboratório de microbiologia e em casa de vegetação, ambos situado na Universidade Federal de Santa Catarina, no *campus* de Curitibanos. As coordenadas geográficas do município são 27°16'44" de latitude sul e 50°34'57" longitude oeste, a 987 m de altitude.

6.2. Obtenção dos isolados de *Pseudomonas* spp.

As amostras de solo para a obtenção dos isolados serão coletadas na propriedade da fazenda Dias, na localidade da Horizolândia, em Curitibanos. Com solo do tipo Cambissolo associado à Nitossolo Bruno (EMBRAPA, 1998). As amostras serão coletadas de 0-20 cm de profundidade, segundo os procedimentos de coleta de amostras de solo da Comissão de química e fertilidade do solo (CQFS, 2004). O solo amostrado será transferido para dois vasos de 5L, onde serão semeados dois bulbilhos de alho, em casa de vegetação. O procedimento constituirá na coleta de fragmentos de raízes de alho em fase inicial de diferenciação, bem como do solo aderido a estas raízes. Vinte gramas serão submetidos à agitação mecânica por 20 minutos, em frascos de Erlenmeyer com 90 mL de solução de NaCl 0,9% esterilizada. A partir da suspensão formada, serão realizadas diluições seriadas, e no final, serão transferidas alíquotas de 0,1 mL das diluições de fator 10^5 , 10^6 e 10^7 para placas de Petri contendo meio King B et al. (1954) que serão incubadas por 48 horas, a 28°C. Posteriormente, as colônias serão observadas sob luz ultravioleta (UV), selecionando-se as que apresentarem fluorescência, (conforme mostrado na Figura 2A). O processo de repicagem das colônias prosseguirá até a purificação destas.

As colônias purificadas serão submetidas ao teste de Gram, conforme mostrado na Figura 2B, e posteriormente, estocadas. Para a estocagem, os isolados serão crescidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio King B líquido, incubados por 48 horas a 29°C. Em seguida, um mL da suspensão será transferido para criotubos, contendo 1 mL de glicerol 80%. Os criotubos, depois de homogeneizados, serão mantidos a -20°C.

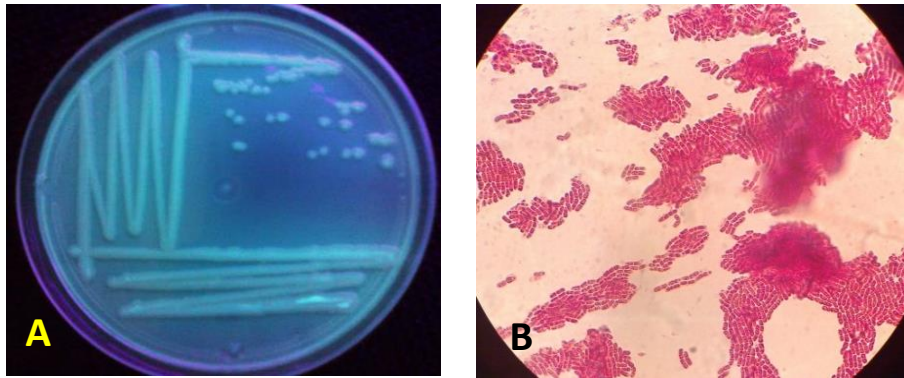


Fig.2. (A) Isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, em presença de luz UV; (B) Análise de isolado em teste de Gram.

Fonte: Arquivo pessoal.

6.3. Avaliação do potencial de promoção de crescimento *in vitro*

A avaliação da promoção de crescimento *in vitro* se dará por meio de teste de solubilização de fosfatos e da produção de ácido-indol-acético. Inicialmente, para o teste de solubilização de fosfatos, os isolados estocados em criotubos serão repicados em tubos contendo 4 mL de meio King B líquido e incubados por 24 horas a 29°C. Após este período, serão transferidas 0,1 mL da suspensão celular de cada isolado para placa de Petri contendo meio NBRIP sólido (NAUTIYAL et al., 1999) acrescido de 0,001g de FeSO₄ e 0,2g de NaCl. Serão colocados quatro isolados em pontos equidistantes na placa de Petri, com cinco repetições. Os isolados serão incubados por 28°C durante sete dias. Serão considerados como solubilizadores de fosfato os isolados que apresentarem halo incolor (solubilização de fosfato) entorno da colônia.

Para avaliação da produção do ácido-indol-acético, será utilizada uma metodologia colorimétrica proposta por Bric, Bostock e Silverstone (1991), adaptada por Cattelan, (1999). Os isolados serão transferidos para placas de Petri contendo meio líquido TSA (Trypcase Soy Agar) 10 %, suplementado com 5 mM de L-triptofano. Para cada placa de Petri serão transferidos até 25 isolados (dependendo do número de isolados obtidos no procedimento anterior), que serão cobertos por membrana de nitrocelulose e incubados a 28°C por 24 horas. A membrana será transferida para solução de Salkowski (GORDON; WEBER, 1951) até perceber-se sua saturação para após, incubá-la a temperatura ambiente. Serão considerados positivos para o teste os isolados que formarem um halo avermelhado na membrana, sendo o teste de caráter qualitativo. Para a avaliação estatística será utilizado um teste binomial, considerando a presença ou ausência de halo de produção de AIA.

6.4. Avaliação do potencial de controle biológico *in vitro* à *Fusarium* spp.

Para a avaliação do potencial de controle biológico serão utilizados como modelo os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, fornecidos pelo Dr. Bécker, da Epagri de Caçador (SC). Inicialmente, um disco de cultura de 7 mm de diâmetro com crescimento ativo de cada isolado do fungo será transferido à placas de Petri contendo meio BDA, que serão incubadas a 26°C, durante quatro dias.

Os isolados de *Pseudomonas* selecionados nas avaliações de promoção de crescimento serão crescidos em tubos contendo King B líquido a 28°C. Após 24h, dez microlitros de quatro isolados serão transferidos para a placa com o fungo, distribuídos em pontos equidistantes, utilizando-se cinco repetições. As placas serão incubadas a 25°C, por 48h. Como controle serão utilizadas placas apenas com o crescimento do fungo e outras com apenas o crescimento bacteriano, incubadas a 25°C. A avaliação do controle biológico terá caráter qualitativo, sendo considerados como positivos os isolados que apresentarem halo de inibição ao crescimento fúngico. Para a avaliação estatística será utilizado um teste binomial, considerando a presença ou ausência de halo de solubilização de fosfatos.

6.5. Teste de promoção de crescimento *in vivo*

No teste de promoção de crescimento *in vivo* será utilizada a variedade de alho Chonan, de ciclo precoce. Para obtenção de suspensão bacteriana de *Pseudomonas* spp. serão selecionados os isolados que apresentarem resultados positivos para produção de AIA ou para solubilização de fosfatos. Cada isolado será transferido para erlenmeyers com 50 mL de meio King B líquido e incubados durante 24 horas a 29°C.

Os bulbilhos de alho serão submetidos à desinfestação antes de serem inoculados nas suspensões bacterianas. A desinfestação se dará na seguinte sequência: lavagem com etanol 70% por três vezes, e em seguida com hipoclorito de sódio 10% durante 20 minutos. Após a retirada do excesso de hipoclorito de sódio com água destilada estéril, os bulbilhos passarão por processo de secagem por 30 minutos em câmara de fluxo laminar. Os bulbilhos de alho serão imersos nas suspensões bacterianas durante 40 minutos, sendo agitados frequentemente. Para secagem, os bulbilhos de alho serão mantidos em câmara de fluxo laminar por 30 minutos.

Será realizada uma contagem do número de células bacterianas contidas na suspensão, através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs). Para isso será realizada a diluição em série, onde alíquotas de 0,1mL de das diluições 10^5 , 10^6 e 10^7 serão dispostas em placas de Petri com meio de cultura King B. A contagem das colônias será realizada após incubação a 28°C por 24 horas.

O plantio dos bulbilhos será realizado em casa de vegetação, em vasos de 5L preenchidos com substrato estéril, com fornecimento de nutrientes através de soluções nutritivas conforme recomendação da RELARE (2012). Serão semeados dois bulbilhos em cada vaso. A avaliação do desenvolvimento das plantas será efetuada em três períodos (30, 60 e 160 dias após o plantio), avaliando-se os parâmetros, estatura da parte aérea, número de folhas, estatura radicular, tamanho comercial dos bulbilhos e peso dos bulbilhos. O delineamento experimental será inteiramente casualizado com cinco repetições, e um tratamento testemunha. Os dados coletados serão submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Dunnet e de SCOTT-KNOTT a 5% de significância, com o auxílio do programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2002).

7. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se verificar o potencial dos isolados de *Pseudomonas* spp., obtidos de amostras de solo da região de Curitiba, na solubilização de nutrientes, como o fosfato, e na produção de ácido-indol-acético. Considerando as relevantes funções destas substâncias no alho, bem como em outras espécies, espera-se observar diferença de crescimento entre os bulbilhos que serão inoculados com estas rizobactérias e os que não receberão a suspensão celular.

Conforme observado por Harthmann et al.(2009), a inoculação de rizobactérias em sementes de cebola resultou no aumento da produtividade desta, através da promoção de crescimento. Presume-se, pelo fato de se tratarem da mesma família, que o alho apresente resultados semelhantes ao ser inoculado com *Pseudomonas* spp.

Espera-se ainda observar o antagonismo de *Pseudomonas* spp. em relação ao fungo *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, causador da podridão seca em alho, como observado em outros trabalhos citando este gênero, envolvendo outras culturas hospedeiras como tomate (RINI; SULOCHANA, 2007); pepino (MELO; VALADRINI, 1995) e alface (SOTTERO et al.,2006).

Em âmbito científico espera-se a publicação de um artigo, além de comunicações em congressos e simpósios da área.

9. ORÇAMENTO

Material	Unidade	Quant.	Valor unit.	Valor total
Membrana nitrocelulose	0.45 µm 30 cm x 3 m	01 un.	300,00	300,00
Placa de Petri descartável	-	200 un.	0,21	42,00
L-triptofano	250g	1 un.	22,66	22,66
Ácido perclórico (HClO ₄)	1L	1 un.	145,00	145,00
Cloreto de ferro (FeCl ₃ .6H ₂ O)	500g	1 un.	39,80	39,80
Solução de HCl	1L	1 un.	21,00	21,00
NaOH	500g	1 un.	9,94	9,94
Ágar bacteriológico	500g	1 un.	266,00	266,00
Meio de cultura BDA	500g	1 un.	255,00	250,00
Dextrose	500g	1 un.	18,90	18,90
Tripticaseína de soja (TSA)	250g	1 un.	760,00	760,00
Álcool 70%	1 L	2 un.	3,50	7,00
NaCl	1kg	1 un.	9,69	9,69
Conjunto corante teste de gram	4 unidades de 500mL	1 un.	36,49	36,49
Ca ⁵ (OH)PO ⁴ -	2000g	1 un.	118,20	118,20
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1000g	1 un.	54,90	54,90
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1000g	1 un.	30,00	30,00
KCl	500g	1 un.	9,90	9,90
NH ₄ 2SO ⁴	500g	1 un.	90,00	90,00
Etanol 70%	1L	1 un.	80,00	80,00
Hipoclorito de sódio 20%	1L	1 un.	15,00	15,00
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ⁴)	500g	1 un.	130,00	130,00
Glicerina	90 mL	6 un.	4,20	25,20
Peptona de carne	250g	1 un.	700,00	700,00
Régua	-	1 un.	2,90	2,90
Pá de corte	-	1 un.	25,00	25,00
Gasolina	-	18 L	2,92	52,56
Vaso plástico 5L	-	20 un.	4,20	84,00
Espátula	-	2 un.	10,00	20,00

Material	Unidade	Quant.	Valor unit.	Valor total
Proveta 100 ml	-	1 un.	8,90	8,90
Béquer 1L	-	2 un.	10,00	20,00
Erlenmeyer 100 mL	-	5 un.	5,00	25,00
Tubos de ensaio 1,45x14cm	-	30 un.	1,70	51,00
Pipeta 1mL	-	10 un.	1,00	10,00
Pipeta 10 ML	-	2 un.	1,26	2,52
Pera para pipeta – 3 vias	-	1 un.	9,90	9,90
Bastão de vidro	-	1 un.	2,20	2,20
Alça de níquel	-	1 un.	13,00	13,00
Pipeta de pasteur de vidro	Caixa 50 unidades	1 un.	16,00	16,00
Pipeta de pasteur plástico	-	5 un.	0,03	0,15
Laminas	-	30 un.	0,02	0,60
Lamínulas	Caixa 100 unidades	1 un.	2,96	2,96
Lamparina	-	1 un.	5,00	5,00
Criotubos esterilizados 2 mL	-	30 un.	0,04	1,20
Serviço de Análise de solo	-	1 un.	40,00	40,00
Bulbilhos de alho	-	1kg	5,00	5,00
Papel alumínio	5 metros	1 un.	2,50	2,50
Algodão	500 g	1 un.	1,20	1,20
Caixa de luvas descartáveis	50 unidades	1 un.	20,00	20,00
Papel toalha	100 unidades	5 un.	20,00	100,00
Estante para tubo de ensaio	-	2 un.	20,00	40,00
Medidor de pH de bancada	-	1 un.	1.237,00	1.237,00
Câmara de fluxo laminar	-	1 un.	8.950,00	8.950,00
Lâmpada UV portátil	-	1 un.	1.200,00	1.200,00
Incubadora bacter. digital 21L	-	1 un.	3.565,00	3.565,00
Freezer compacto 66L	-	1 un.	695,00	695,00
TOTAL				19.390,27

Ainda outros equipamentos serão necessários para o desenvolvimento do projeto, sendo estes adquiridos junto à universidade, tais como: Casa de vegetação Van Der Hoeven, microscópio óptico, agitador de tubos de ensaio, autoclave vertical e balança analítica.

10. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Flórida: Elsevier Academic Press, 2004.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, A. AMORIN, L. (Eds). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.717-728, 1995.
- BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 451-458, 2011.
- BEDENDO, I. P.; MASSOLA JR, N. S.; AMORIN, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de planta. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.
- BIASI, J. Nutrição e indicação de adubação para a cultura do alho. Florianópolis: epagri, 2006. 60 p. (Epagri. Boletim técnico, 132).
- BHOLAY, A. D.; JADHAV, U. P.; BORKHATARIA, B. V. Fluorescent pseudomonads as plant growth promoting rhizobacteria and their siderophoregenesis. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. v.3, p. 27-32, 2012.
- BOSSIS, E. et al. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. **Agronomie**, v.20, p.51-63, 2000.
- BOTELHO, G. R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. *Fluorescent pseudomonads* associated with the rhizosphere of Crops - an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.401-416, 2006.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay of indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.57, p.531-538, 1991.
- BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para produção de mudas de *Pinus spp.*** 2006. 35 f. Tese. (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne disease by rhizobacteria. **Journal of plant disease and protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.
- CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa soja, 1999. 36p. (Embrapa soja. Documentos 139).
- CHAIM, A.; ROSA, T. S. F.; VALARINI, P. J. **Manejo de agrotóxico e qualidade ambiental**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 1999. (Embrapa meio ambiente. Documentos, 5).

CIPRIANO, M.A.P. **Potencial de *Pseudomonas* spp na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico.** 2009. 25 f. Dissertação (mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais). Faculdade de agricultura tropical e subtropical, Instituto agrônômico, Campinas, 2009.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** 10. ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

DALONSO, N. et al. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência de Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 793-797, 2009.

EMBRAPA. Levantamento de reconhecimento dos solos de Santa Catarina. Rio de Janeiro: Embrapa – CNPS, 1998.

FERNANDES, F. R.; DUSI, A. N.; RESENDE, F. V. **Viroses do alho no Brasil: importância e principais medidas de controle.** Brasília: Embrapa hortaliças, 2013. 9p. (Embrapa hortaliças. Circular técnica, 122).

FILGUEIRA, F. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2007. 412p.

FREITAS, S. S., MELO, A. M. T., DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista brasileira de ciências do solo**, Londrina, v. 27, p. 61-70, 2003.

FREITAS, S. S., AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção de crescimento de plantas cítricas. **Revista brasileira de ciências do solo**, Campinas, v. 28, p. 987-984, 2004.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant physiology**, Bethesda, v.26, p. 192-195, 1951.

HARTHMANN, O. E. L, et al. Rizobactérias no crescimento e na produtividade de cebola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.462-465, 2010.

HILTNER, L. Überneuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unterbesonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arbeiten Deutsch, Landwirtsch.-Ges**, v.98, p.59-78, 1904.

IBGE (a).Produção Agrícola Municipal 2012. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.

IBGE (b).Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. v.25, n.2.p.1-88. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.

KING, E.O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal Laboratory Clinical Medic**, v.44, p.301-307, 1954.

LOPER, J. E., BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces.**Molecular plant-microbeinteraction**, St Paul, v. 4, p. 5-13, 1991.

LUCINI, M. A. [Sem título]. 2013. 1 fotografia.

LUCINI, M. A. **Alho: manual prático de produção**. Curitiba: Bayer CropScience, 2004.

LUCINI, M. A. **O alho no Brasil: um pouco da história dos números do nobre roxo**. Curitiba: EPAGRI, 2008.

LUCINI, M.A. **Principais doenças fúngicas na cultura do alho**. 2ed. Curitiba: EPAGRI, 2009.

MASSOLA JR, N. S.; JESUS JR, W. C.; KIMATI, H. Doenças do alho e da Cebola. In: KIMATI et al. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2, ed.4. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.53-63, 2005.

MELO, L. S.; VALADRINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.52, n2, 1995.

MOURA, A. P. et al. Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho. Brasília: Embrapa hortaliças, 2013. 12p. (Embrapa hortaliças. Circular técnica, 118).

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

RACHID, D.; AHME, B. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 697-702, 2005.

RELARE, 16., 2012. Londrina. **Reunião da rede de laboratórios para a recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola**. Londrina: Embrapa soja, 2012.

RINI, C. R.; SULOCHANA, K. K. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. **Journal of Tropical Agriculture**, Kerala, v.45, p.21-28, 2007.

SILVA, F.A. S. E.; AZEVEDO, C. A. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p71-78,2002.

SILVA, E. R. **Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias**. 2011. 23 f. Dissertação (mestrado em Gestão de recursos agroambientais). Faculdade de agricultura tropical e subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, 2011.

SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA DE SANTA CATARINA 2011-2012. Florianópolis: Epagri/Cepa, 1976-. Anual. ISSN 1677-5953.

SOPHER, C. R.; SUTTON, J. C. Quantitative relationships of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 to *Pythium* root rot and growth in hydroponic peppers. **Tropical plant pathology**, v. 36, 2011.

SOTTERO, A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista brasileira de ciências do solo**, Campinas, v.30, n.2, 2006.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C.S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Ciência Agrária**, Londrina, v.23, p.53-60, 2007.

SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. S. **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 181p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed.10. Porto alegre: Artmed, 2012.934p.

VOISARD, C. et al. Biocontrol of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. In: O'GARA, F., DOWLING, D. N., BOESTEN, B. (eds). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Germany: VCH, 1994. p. 67-89.

WELLER, D. M., THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O'GARA, F., DOWLING, D. N., BOESTEN, B. (eds). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Germany: VCH, 1994. p. 67-89.