

Pseudomonas fluorescentes associadas à olerícolas sob sistema de produção orgânico

Fluorescent pseudomonads associated with vegetables under organic practices

ZAGO, Valéria Cristina Palmeira¹; DE-POLLI, Helvécio²; RUMJANEK, Norma Gouvêa²

¹Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, Brasil, valeria.zago@ufms.br; ²Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ, Brasil, norma@cnpab.embrapa.br; depollih@gmail.com

RESUMO: Avaliou-se a diversidade de populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes associadas à alface, cenoura e pepino, cultivados em sistema orgânico. O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados, com três repetições. Foi incorporado ao solo anterior ao plantio, 20 t/ha de esterco bovino curtido e 1,5 t/ha de termofosfato. As amostras de solo foram separadas em ectorizosfera, rizoplano, endorizosfera e filoplano por olerícola. Os isolados bacterianos que apresentaram fluorescência sob luz UV foram selecionados e caracterizados conforme a morfologia de suas colônias, sendo que um isolado, de cada um dos grupos mais representativos quantitativamente, foi identificado pelo Sistema API 20NE. Foram selecionados 25 isolados, identificados como *P. putida*, das culturas de alface e cenoura para caracterização por RAPD. A análise fenotípica permitiu a identificação de alguns grupos de isolados associados à alface, cenoura e pepino. Existe uma alta diversidade de estirpes, revelada pela caracterização fenotípica e genotípica, associada às olerícolas estudadas, sob sistema orgânico de produção.

PALAVRAS-CHAVE: *Pseudomonas* spp., probióticos de plantas, adubação, diversidade genética.

ABSTRACT: Diversity of fluorescent pseudomonads associated with lettuce, carrot and cucumber under organic practices was studied. The experimental design was random blocks, with three replicates. Prior to planting, 20 t/ha of cattle manure and 1,5 t/ha of thermophosphate were applied to the soil. Soil samples were separated into rhizosphere, rhizoplane, roots and phylloplane of the crops. Bacterial isolates which presented fluorescence under UV light were selected. These isolates were classified accordingly to their colony morphology. One isolate from one of the quantitatively most representative groups was identified by the API 20 NE system. Twenty-five isolates were selected, identified as *P. putida*, from ectorrhizosphere, rhizoplane, phylloplane e endorhizosphere of the three plant species for RAPD characterization. The phenotypic analysis allowed the identification of certain groups of isolates associated with lettuce, carrot and cucumber. There is a high diversity of strains, revealed by genotypic and phenotypic characterization, associated with vegetables studied under organic production system.

KEY WORDS: *Pseudomonas* spp, plant probiotics, organic fertilization, diversity.

Introdução

Na rizosfera, onde a atividade microbiana é muito alta, tanto as populações de microrganismos, quanto a sua diversidade, podem responder drasticamente às mudanças ambientais (SAITO, 2004). Dentre os fatores que alteram as inter-relações da microbiota edáfica estão as condições geográficas e climáticas, os atributos físicos, químicos e outros organismos do solo, práticas agrônômicas, supressividade ou condutividade do solo e a planta hospedeira (diferentes espécies, genótipos, estádios de desenvolvimento e exsudatos radiculares, entre outros) (PICARD & BOSCO, 2008).

Ademais, as plantas podem como estratégia de defesa contra patógenos, favorecer o estabelecimento de grupos específicos de microrganismos antagonistas nativos do solo (HARTMANN et al., 2009). Estes microrganismos têm sido recentemente definidos como “probióticos”, pois apresentam características que promovem a sanidade das plantas, tais como biocontrole de uma enorme gama de fitopatógenos (HAAS & KEEL, 2003).

Dentre esses microrganismos, encontram-se as pseudomonas fluorescentes, produtoras de compostos antimicrobianos e que estão envolvidas na supressão de numerosos fitopatógenos de solo, incluindo bactérias, fungos e nematóides (RAAIJMARKERS et al., 2002).

Estudos demonstram que a utilização de práticas agrícolas conservacionistas, aumentando a matéria orgânica, melhorando a estrutura, aeração e teores de umidade do solo, proporcionam ao agroecossistema, condições para exercer um controle biológico natural, ou seja, melhorando sua supressividade (GAMLIEL et al., 2000; BAILEY & LAZAROVITS, 2003).

Há evidências de que a severidade de doenças em plantas é menor em sistemas de cultivo com reduzido aporte de insumos ou com adubação orgânica (SOLTANI & LAZAROVITS, 1999; GAMLIEL et al., 2000). O sistema de produção

orgânica agrícola apresentou efeitos benéficos no aumento da biodiversidade microbiana, quando comparado ao sistema convencional (MADER et al., 2002; TU et al., 2006).

Desta forma, com uma melhor compreensão das populações dos probióticos de plantas, presentes em um solo saudável, como aquele trabalhado em sistema orgânico de forma prolongada, pode-se aproveitar o potencial desses microrganismos nativos, para manejar as doenças presentes comumente nos agroecossistemas (van BRUGGEN & SEMENOV, 2000). Portanto, representaria uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos (PICARD & BOSCO, 2008).

Assim sendo, esse estudo objetivou avaliar a diversidade de populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes associadas à alface, cenoura e pepino, produzidos num sistema orgânico.

Material e Métodos

Área Experimental e Amostragem

O experimento foi realizado na área do projeto “Fazendinha Agroecológica”, Embrapa-Agrobiologia, Seropédica-RJ, num Planossolo háplico distrófico, com as seguintes características químicas: pH em água = 6,2; Al trocável = 0,0 $\text{cmol}_c \cdot \text{kg}^{-1}$; Ca + Mg trocável = 350 $\text{cmol}_c \cdot \text{kg}^{-1}$; P extraível = 11 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e K extraível = 270 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Embrapa, 1997). O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados, com três repetições, no período de maio a agosto/1999. Foram incorporadas 20 $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$ de esterco bovino curtido e 1,5 $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$ de termofosfato ao solo, anterior ao plantio. As culturas utilizadas foram alface, cenoura e pepino, com os espaçamentos: 20 x 20 cm, 10 x 15 cm e 80 x 50 cm, respectivamente.

Foram amostradas três plantas centrais das parcelas, incluindo o solo aderido às raízes. Para as amostras de filoplanos, as folhas foram retiradas cuidadosamente e colocadas em saco

plástico estéril. Após este procedimento, as amostras foram conduzidas ao laboratório em caixa de isopor com gelo. Foram também retiradas amostras de solo e do esterco utilizado na adubação.

Obtenção de Isolados de Pseudomonas spp.

Foram separados as raízes e o solo aderido, para comporem as amostras de rizoplane (superfície radicular) e ectorizosfera (solo aderido às raízes), respectivamente. As raízes foram rinçadas com água ésteril, antes da primeira diluição. Baseado nos pesos das amostras foi calculado o volume da solução extratora $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,1 M (por exemplo 10g:90ml), ou seja, para a diluição 10^{-1} , a qual foi homogeneizada em agitador horizontal (5 mim, 150 rpm).

Uma pequena quantia de raízes foi esterilizada por 30 segundos em álcool 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio a 0,5 %, novamente 30 segundos em álcool 70% e rinçada quatro vezes com a solução extratora. Posteriormente, as raízes foram maceradas com um pistilo, com um volume da solução extratora, conforme o peso da amostra (diluição 10^{-1}), compondo a amostra de endorizosfera (partes internas das raízes).

Para as amostras de filoplane (superfície das folhas), foi inserido um volume de solução extratora no saco plástico com a amostra, conforme o peso da mesma (diluição 10^{-1}). O saco plástico foi agitado por 1 minuto, sendo a solução transferida para erlenmeyer estéril.

As amostras foram processadas seguindo o método da diluição seriada até 10^{-4} , após o que, alíquotas de 100 μ l de cada diluição foram transferidas para o centro de placas de Petri, contendo meio seletivo King B modificado com antibióticos: ciclohexanina – 100 ppm, ampicilina – 50 ppm e cloranfenicol – 12,5 ppm (KING et al., 1954; GEELS & SCHIPPERS, 1983) e espalhadas com alça de Drigalski. Cada diluição foi plaqueada

em duplicata.

As placas foram incubadas de 27 a 30°C por 48 horas. Após este período, todas as placas (diluições 10^{-2} a 10^{-4}) foram visualizadas em lupa, onde as colônias morfológicamente diferentes eram identificadas e contadas. As bactérias visualmente diferentes, por sua vez, foram purificadas numa nova placa, com o mesmo meio. Os isolados foram preservados em 50% glicerol em freezer $-80^{\circ}C$ e também em meio KB líquido + 50 % glicerol a $-4^{\circ}C$.

Caracterização Morfológica e Fenotípica dos Isolados

Foram selecionados isolados que apresentaram fluorescência sob luz UV, com comprimento de onda 366 nm. Estes isolados foram caracterizados conforme a morfologia da colônia: tamanho (puntiforme, entre 1-2 mm e >2 mm); forma (circular ou irregular); borda (lisa ou denteada); colônia (homogênea ou heterogênea); transparência (opaca ou transparente); quantidade de muco (pouca, média ou muita), elasticidade do muco (pouca ou muita), presença de elevação (sim ou não) e cor (amarelo claro, amarelo forte, amarelo esverdeado e creme).

A partir das características morfológicas, os isolados foram agrupados e, um isolado, escolhido de cada um dos grupos mais representativos quantitativamente, foi identificado pelo Sistema API 20NE (Analytab Products, Plainview, NY). Após inoculação com os isolados, as galerias de testes foram incubadas por 24 e 48 h, a 30°C, sendo usados os resultados de 48 h, com exceção dos testes com os substratos (nitrato de potássio, triptofano e glicose), cujas leituras foram feitas com 24 h, conforme as instruções do fabricante. Cada galeria apresentou, como resultado, um perfil numérico, que foi comparado ao Índice Analítico de Perfis do API 20NE.

Com os dados da classificação do API 20 NE,

foi montada uma matriz de similaridade empregando o programa NTSYS, através do coeficiente de similaridade (Coincidência Simples - SM) e, posteriormente, realização de análise estatística não-paramétrica para construção de um dendrograma pelo método de distância matriz (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - UPGMA), o qual emprega um algoritmo de agrupamento seqüencial, em que relações topológicas são identificadas em ordem de similaridade (ROHLF, 1994).

Caracterização Genotípica de Isolados de *P. putida* - Foram selecionados 25 isolados, identificados pelo API 20 NE como *P. putida*, oriundos da rizosfera, rizoplano, filoplano e macerado radicular, das culturas de alface e cenoura para caracterização por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Lise celular para extração do DNA

As bactérias foram crescidas durante 24 horas em meio KB sólido. Uma alçada cheia das colônias isoladas foi ressuspensa em 1000 µl de água deionizada e autoclavada, sendo homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Dessa suspensão, uma alíquota (100 µl) do material foi diluída em 900 µl e fervida à 94°C por 10 minutos e, posteriormente, colocada no gelo por 10 minutos. Esta diluição foi congelada à -20°C. A reação de amplificação do DNA foi realizada em um volume final de 25 µl, sendo 3 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 µl do Tampão (1 mM Tris-HCl pH 9,0; 25 mM KCl, 0,01 % Triton X-100), 0,5 µl de dNTPs (0,2 mM cada), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (1 U) e 1,0 µl do primer Kit E (0,2 µM) (OPERON Technologies, Inc., Alameda, Califórnia).

Os primers da Operon Technologies, Kit E, com conteúdo GC de 60 e 70%, foram avaliados quanto a sua capacidade de amplificação e ao aparecimento de polimorfismo pela técnica de

RAPD.

A alíquota da amostra foi calculada para que esta contivesse 25 ng de DNA. O volume final (25 µl) foi completado com H₂O deionizada e autoclavada. A reação foi realizada em um termociclador (Perkin Elmer GeneAMP PCR System 9600), usando 1 ciclo inicial de 94°C por 1 minuto; 45 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 32°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão a 72°C por 2 minutos e, finalmente a temperatura foi mantida a 4°C até a retirada das amostras para estocagem. Os produtos de PCR foram mantidos congelados até a análise de eletroforese.

Separação e visualização dos produtos de PCR

Foram usados 8 µl da amostra amplificada adicionada de 2 µl de corante blue/orange (Promega) para a separação dos fragmentos em gel de agarose (1,5%) e tampão TBE (0,5X). A corrida foi realizada a 100 V durante 1 hora e 20 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (5 mg/ml) por 5 minutos e descorado em H₂O deionizada e autoclavada. Posteriormente, visualizado em transiluminador sobre luz ultravioleta e fotografado em polaroide (filme 6655). Um marcador de peso molecular conhecido foi utilizado do tipo X174 RF/Hae III de 1.350 pb.

Determinação da análise filogenética intraespecífica de *P. putida*

As bandas foram analisadas quanto a presença ou ausência em determinadas posições no gel, recebendo valor 1 ou zero, respectivamente. Estes valores foram utilizados para calcular uma matriz de similaridade, utilizando o programa NTSYS, empregando o coeficiente de similaridade (Coincidência Simples - SM) e, posteriormente a realização de análise estatística não-paramétrica para construção de dendrograma pelo UPGMA.

Pseudomonas fluorescentes associadas

Os isolados obtidos de rizosfera, rizoplano, filoplano e macerado radicular foram submetidos à análise de multivariância pela versão on-line do software ADE-4 (NETNUL on-line, Thioulouse *et al.*, 1997).

Resultados e Discussão

Quinhentos e dez isolados foram agrupados em 49 grupos morfológicos, sendo que as características que mais contribuíram para o agrupamento foram elasticidade, cor, tamanho e transparência. Observou-se que os grupos mais abundantes foram aqueles compostos por isolados com pouca elasticidade, maior de 1 mm, transparentes e com colônia amarelo claro ou amarelo esverdeado. Outro grupo expressivo apresentou as mesmas características, todavia com colônia opaca. Além de um grupo formado por 39 isolados com colônia amarelo forte, onde 37 apresentaram pouca elasticidade, tamanho puntiforme e transparente.

Segundo Cattelan (1999), a cor formada pela colônia tem sido apontada como uma característica capaz de discriminar entre as diferentes espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Em coleção de isolados associados às raízes de trigo em sistema de plantio direto e convencional, obtido em meio King B modificado, também se observou um grupo de isolados com as características morfológicas, pouca elasticidade, transparente e amarelo forte, bastante semelhante ao terceiro grupo mais abundante nesse experimento (FERREIRA, 2002). Podem-se considerar as *Pseudomonas* um dos grupos mais complexos de bactérias gram-negativas, pelas suas similaridades fenotípicas com outros gêneros. Além do que, algumas espécies anteriormente identificadas como *P. cepacia*, *P. gladioli* e *P. caryophylli*, produzem pigmentos amarelo-esverdeados que são, às vezes, confundidos com pigmentos fluorescentes (PALLERONI & MOORE, 2004). Não obstante, os métodos baseados no

isolamento e cultivo permanecem sendo o primeiro passo no estudo da diversidade das populações de pseudomonas fluorescentes do solo e rizosfera. Além de serem indispensáveis para obtenção de culturas puras que componham coleção de estirpes para caracterização ou uso em biotecnologia (LUMINI & BOSCO, 1999).

Dos grupos morfológicos formados, 81 isolados, representantes dos 35 grupos mais numerosos, foram identificados utilizando-se o sistema API 20 NE. A maior parte dos isolados foi identificada como *Pseudomonas putida* (38%), *Pseudomonas fluorescens* (22%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%), *P. putida/P. fluorescens* (11%), sendo que este grupo refere-se a alguns isolados, para os quais o sistema API 20 NE não forneceu bons índices de identificação. Os demais isolados (19%) foram identificados em outros gêneros.

Os isolados foram agrupados em 15 grupos (nível de similaridade de aproximadamente 90%) e representados através de um dendrograma.

Os grupos de 1 a 3 foram identificados como *P. fluorescens* e os grupos 4 e 5, compostos exclusivamente por *P. putida*. O grupo 6 incluiu *P. putida* e alguns isolados identificados como "aproximadamente" *P. mendocina*, enquanto o grupo 7 agrupou isolados *P. putida/P. fluorescens*, referentes àqueles em que o kit não forneceu bons índices de identificação. Este tipo de identificação dada pelo kit API 20 NE foi denominada de grupos intermediários entre as espécies de *P. putida* e *P. fluorescens* por Lemanceau *et al.* (1995). Apesar de se detectar variação intra-específica em ambas as espécies, estudos mostram que os sistemas de classificação baseados na utilização de substratos têm mostrado baixa eficiência nessa discriminação (GARDENER *et al.*, 2000; McCAIG *et al.*, 2001).

Os grupos de *P. putida* e *P. fluorescens* revelaram a heterogeneidade dos isolados analisados. Estudos mostram que em comparação ao sistema de produção agrícola convencional, o sistema orgânico apresenta efeitos benéficos no

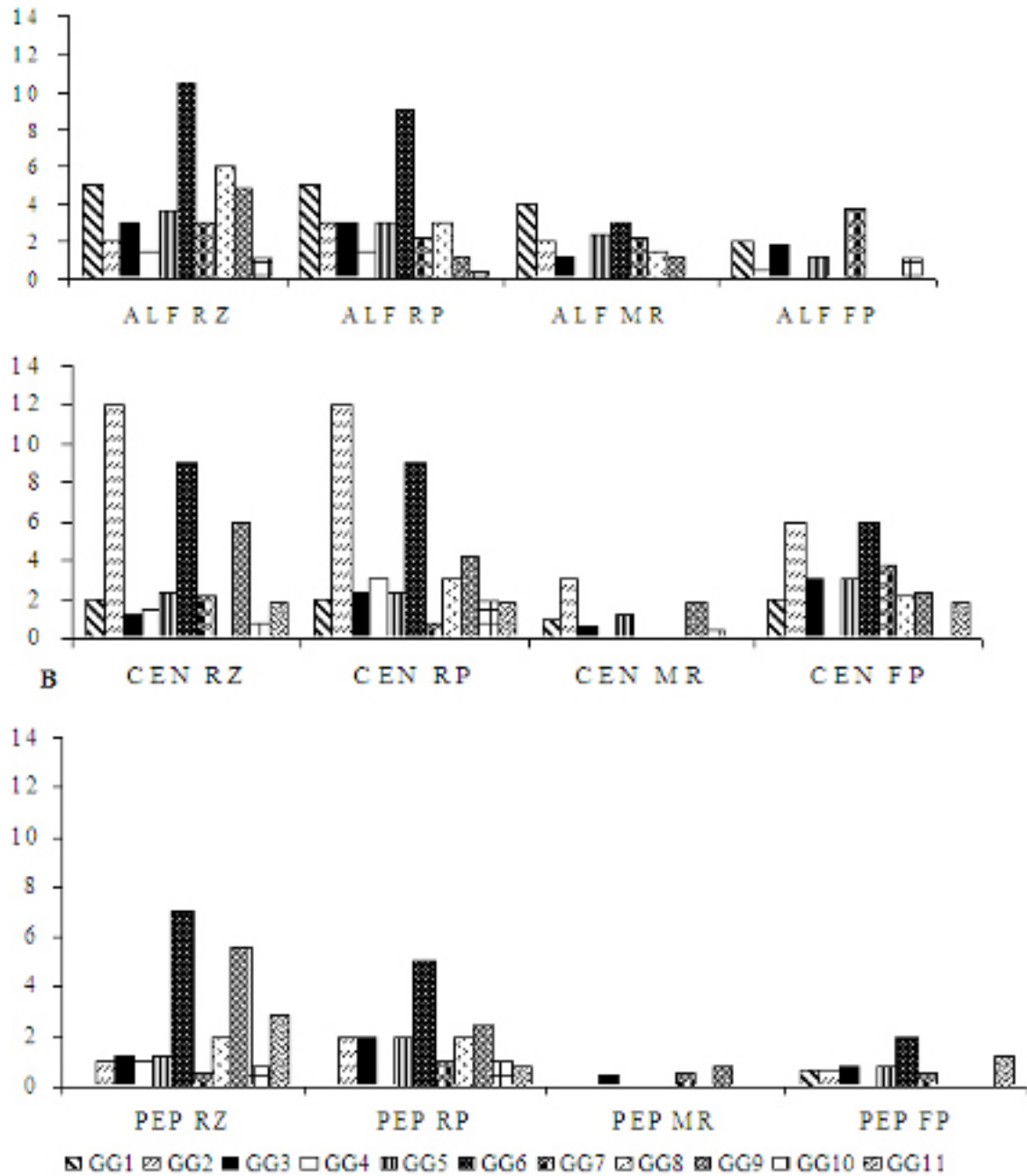


Figura 1: Distribuição dos isolados nos grandes grupos (média do quantitativo de isolados), no extrato de ectorizosfera, rizoplano, endorizosfera e filoplano de alface, cenoura e pepino sob cultivo orgânico. GG = grande grupo, ALF=alface, CEN=cenoura, PEP=pepino, RZ=ectorizosfera, RP=rizoplano, MR=endorizosfera e FP=filoplano.

aumento da biodiversidade microbiana (MADER *et al.*, 2002; TU *et al.*, 2006). No entanto, o impacto que as diversas práticas agrônômicas causam, especificamente, à diversidade das populações dos probióticos *Pseudomonas* fluorescentes, foi até então pouco analisado (PICARD & BOSCO, 2008).

O grupo 8 reuniu os isolados de *P. aeruginosa*, o grupo 9 aqueles identificados como *Ochrobacter anthropi* e o grupo 10 correspondeu a dois isolados de *Burkholderia cepacia/B. gladioli*. Finalmente, os grupos de 11 a 15 compreendem um único isolado em cada um deles, sendo estes: *Burkholderia pseudomallei/P. fluorescens*, *P. fluorescens*, um perfil não identificado, *Comomonas acidovorans* e *Vibrio sp.*, respectivamente.

As espécies *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e

Comomonas acidovorans pertenciam anteriormente ao gênero das *Pseudomonas*, mas estudos posteriores as reclassificaram e, atualmente, pertencem às Proteobactérias subclasse β , enquanto o gênero *Pseudomonas*, subclasse γ , grupo I rRNA (KERSTERS *et al.*, 1996).

A ectorizosfera e o rizoplano, nas três culturas, apresentaram maior número de grupos e semelhantes entre si, que os compartimentos endorizosfera e filoplano, evidenciando que apenas algumas estirpes conseguem colonizar o interior dos tecidos e a superfície foliar.

Tanto na ectorizosfera quanto no rizoplano de alface, o grupo predominante foi o GG 6, que abrange isolados de *P. fluorescens* e de *P. putida*, pela identificação por API20NE. Na ectorizosfera

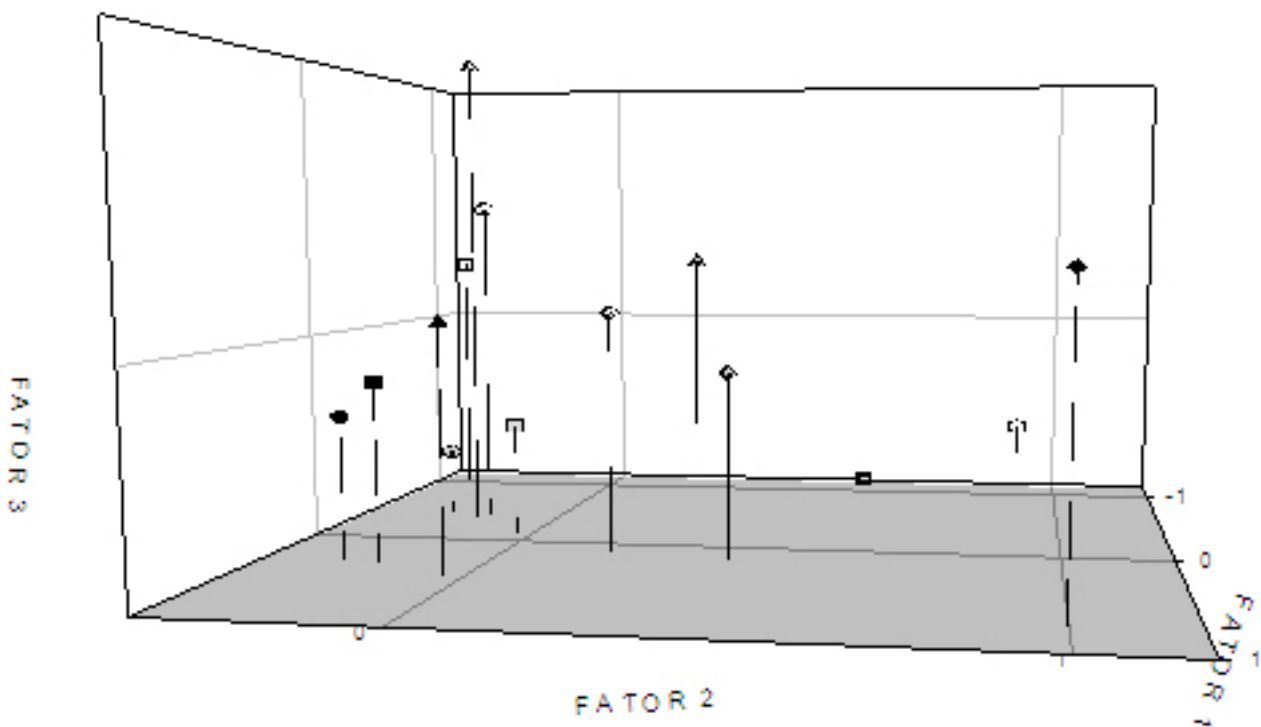


Figura 2: Análise multivariada (Correspondência) da distribuição dos isolados obtidos de extrato de ectorizosfera (O), rizoplano (□), filoplano() e endorizosfera (Δ) de alface, cenoura e pepino, nos Grandes Grupos Fenotípicos.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 27 30

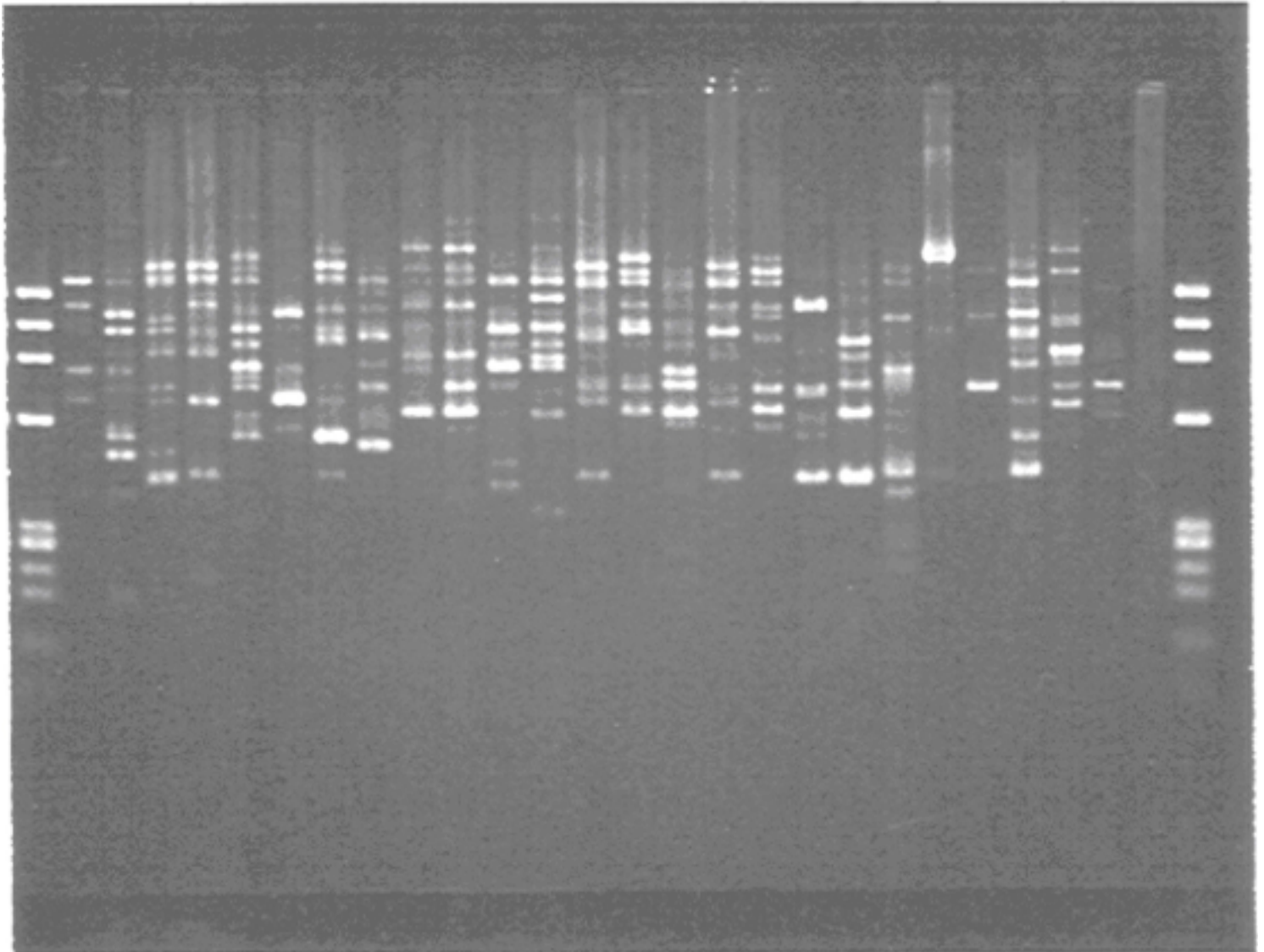


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose (3 %; P/V), mostrando os perfis de RAPD de isolados de extrato de rizoplano e tecido radicular macerado, obtidos com o primer OPE-17. M (marcador) = Φ -X174-RF DNA, isolados de cenoura: 1 (C1 TR11), 2 (C1TR1), 3 (C1P3), 4 (C1P6), 5 (C2P43), 6 (C2P34), 7 (C1P8), 8 (C2P21), 9 (C1P12); isolados de alface: 10 (A2M8), 11 (A1P7), 12 (A2P18), 13 (A2M4), 14 (A1P18), 15 (A1P5), 16 (A2M1), 17 (A1P16), 18 (A1MR16), 19 (A1MR6), 20 (A2P17), 21 (A2P22), 22 (A2M3), 23 (A1P20), 30 (A2M9) e 27 (GN1102-fonte CNPS, padrão de *P. putida*).

Pseudomonas fluorescentes associadas

desta cultura, os GGs 1, 2, 3 e 4, que compreendem principalmente os isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e os GGs 8, 9 e 10, abrangendo os isolados de *Pseudomonas putida*, equipararam-se em relação à frequência em que aparecem neste compartimento. No entanto, no rizoplano, macerado radicular e filoplano de alface houve uma pequena diferença, favorecendo *P. fluorescens*. Não se observaram isolados de *P. aeruginosa* nos compartimentos de alface (Figura 1).

Na cenoura, no entanto, observa-se uma tendência maior para *P. fluorescens*, especialmente devido ao GG 2, sendo este, o grupo mais expressivo na ectorizosfera e rizoplano, seguido do GG 6. Nos compartimentos endorizosfera e filoplano, apesar de em menor número, é possível verificar uma determinada equivalência entre os grupos de *P. fluorescens* e *P. putida*. O grupo de *P. aeruginosa* foi observado tanto em rizosfera, rizoplano e filoplano, excluindo apenas o compartimento macerado radicular (Figura 1).

Na ectorizosfera e rizoplano da cultura do pepino, predominam os grupos referentes à *P. putida*, entretanto, o GG 6 é maior em expressão. Nos compartimentos endorizosfera e filoplano, provavelmente devido à dificuldade no ajuste metodológico, houve poucos grupos e em pequeno número, com apenas presença dos grupos de *P. fluorescens*. Em pepino, o grupo de *P. aeruginosa* aparece em rizosfera, rizoplano e filoplano, não sendo observado em endorizosfera (Figura 1).

A quantidade e composição dos exsudatos radiculares influenciam seletivamente no crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera, incluindo a abundância relativa e a diversidade das rizobactérias indígenas, através da alteração das propriedades químicas do solo nas regiões próximas às raízes das plantas (YANG & CROWLEY, 2000; HUTSCH *et al.*, 2002).

Em alface e cenoura consorciadas, sob cultivo

orgânico, foi possível verificar alguns grupos morfológicos preferencialmente associados às culturas (FONSECA *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado que a composição da população de pseudomonas fluorescentes varia significativamente quando são comparadas a rizosfera de diferentes espécies de plantas, no mesmo solo (LEMANCEAU *et al.*, 1995; BERG *et al.*, 2002).

Através de análise de correspondência, utilizando-se o programa ADE-4 (THIOULOUSE *et al.*, 1997), também se verificou uma tendência de agrupamento dos isolados destes compartimentos por cultura, reforçando a especificidade parcial por cultura.

Esse comportamento é destacado no agrupamento da ectorizosfera e rizoplano em cada uma das culturas. Os isolados das endorizosferas foram aqueles que mais se distanciaram dos isolados obtidos no solo e esterco. Enquanto que, a tendência observada nos filoplanos das três culturas, foi a de agruparem-se mais próximos ao solo e esterco, provavelmente devido aos respingos de solo sobre as folhas, durante a irrigação ou mesmo pelo ar (Figura 2).

Lemanceu *et al.* (1995) também observaram que os isolados de ectorizosfera e de rizoplano de linho e tomate mostraram características fenotípicas similares, algumas vezes também associados aos isolados das endorizosferas, e raramente com isolados obtidos diretamente do solo. Ou seja, em relação às técnicas de isolamento empregadas, diferentes níveis taxonômicos da diversidade microbiana existente no ambiente podem ser detectados (ENWALL *et al.*, 2005).

Os isolados de *P. putida* que foram amplificados pela técnica RAPD revelaram elevado polimorfismo intraespecífico (Figura 3). Moenne-Loccoz *et al.* (2001), ao estudarem o impacto de *P. fluorescens* F113Rif nas estirpes nativas de *Pseudomonas* fluorescentes,

associadas às raízes de beterraba, observaram alta diversidade destas populações, utilizando testes bioquímicos e análise genotípica, pela técnica de RAPD. Por outro lado, Mavrodi et al. (2001) encontraram uma maior diversidade genética entre as estirpes de pseudomonas fluorescentes, produtoras de diacetilcloroglucinol, utilizando RAPD, em comparação à técnica rep-PCR.

Conclusões

A análise fenotípica, feita através do API20 NE, permite a identificação de alguns grupos de isolados das espécies *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, associados às espécies vegetais estudadas. Existe uma alta diversidade de estirpes, observada tanto pela caracterização fenotípica (API 20NE), quanto à genotípica (RAPD), associada às olerícolas estudadas, sob sistema orgânico de produção.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de doutorado à primeira autora. A João Luiz Bastos e Aline de Fátima Santos Câmara por colaborarem na condução dos trabalhos de campo e laboratório.

Referências

- BAILEY, K.L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 169 -180, 2003.
- BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3328-3338, 2002.
- BIOMÉRIEUX. Analytical Profile Index: API 20 NE, 251 p., 1997.
- CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para**

determinação de características bioquímicas e fisiológicas associados com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 36 p. 1999 (Embrapa Soja. Documentos, 139).

- EMBRAPA- Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Rio de Janeiro. **Manual de Métodos de Análises de Solo.** Rio de Janeiro, CNPS, 1997.
- ENWALL, N. J.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8335-8343, 2005.
- FERREIRA, E.B. P. Impactos de sistemas de manejo do solo e de rotação de culturas sobre a funcionalidade e a diversidade da microbiota do solo. UFRRJ. Seropédica-RJ, 123 p., 2002 (Tese de Mestrado).
- FONSECA, M.C. Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes num sistema integrado de produção agroecológica. UFRRJ. Seropédica-RJ, 2003. (Tese de Doutorado).
- GAMLIEL, A.; AUSTRWEIL, M.; KRITZMAN, G. Non-chemical approach to soilborne pest management – organic amendments. **Crop Protection**, v. 19, p. 847-853, 2000.
- GARDENER, M.B.B; SCHROEDER, K. L.; KALLOGER, S.E.; RAAIJMAKERS, J.M.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Genotypic and phenotypic diversity of pH1D-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 1939-1946, 2000.
- GEELS, F.P.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology Z.**, v. 108, p. 207 – 214, 1983.
- HARTMANN, A.; SCHMID, M.; van TUINEN, D.; BERG, G. Plant –driven selection of microbes. **Plant Soil**, v. 321, p. 235-257, 2009.
- HASS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production I root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117-153, 2003.
- KERSTER, K.; KUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SCHLEIFER, K-H. Recent changes in the classification of the *Pseudomonas*: an overview. **Systematic**

- Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 465-477, 1996.
- KING, E.O.; WARD, M. K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p.301-307, 1954.
- LEMANCEAU, P.; CORDERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.M.; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1004-1012, 1995.
- LUMINI, E.; BOSCO, M. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms for assessing and increasing biodiversity of Frankia culture collections. **Canadian Journal of Botany**, v. 77, p. 1261-1269, 1999.
- MÄDER, P.; FLIEBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, p. 1694-1697, 2002.
- McCAIG, A.E.; GRAYSTON, S.J.; PROSSER, J.I.; GLOVER, L.A. Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 37-48, 2001.
- MOËNNE-LOCCOZ, Y.; TICHY, H. V.; O'DONNELL, A.; SIMON, R.; O'GARA, F. Impact of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on Intraspecific Diversity of Resident Culturable Fluorescent *Pseudomonas* Associated with the Roots of Field-Grown Sugar Beet Seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3418-3425, 2001.
- PALLERONI, N. J.; MOORE, E.R.B. Taxonomy of *Pseudomonas*: Experimental Approaches. In: RAMOS, J-L. (ed). *Pseudomonas*. New York, USA: Plenum Publishers, 2004, p.3-44.
- PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. **Naturwissenschaften**, v. 95, n.1, p.1-16, 2008.
- RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; de SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p.537-547, 2002.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-PC – Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, University of New York, 1994.
- SAITO, M. Can Soil Biodiversity be used for an indicator of soil health? Case studies in Japan. In: **Agricultural Impacts on Soil Erosion and Soil Biodiversity**. 2004. 9p. Disponível em: <<http://www.webdomino1.oecd.org>> Acesso em: 25 nov. 2007.
- SOLTANI, N.; LAZAROVITS, G. Effects of ammonium lignosulfonate on soil microbial populations, *Verticillium wilt*, and potato scab. In: PROCEEDINGS OF THE 6TH ANNUAL INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON METHYL BROMIDE ALTERNATIVES AND EMISSION REDUCTION, San Diego CA, p.27-28, 1999.
- THIOLOUSE, J.; CHESSEL, D.; DOLÉDEC, S.; OLIVER, J.M. **ADE-4 multivariate analysis and graphical display software**. Statistics and Computing. Lyon, v. 7, p. 75-83, 1997.
- TU, C.; RISTAINO, J.B.; HU, S. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: Effects of organic inputs and straw mulching. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 247-255, 2006.
- YANG, C-H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 345-351, 2000.