

---

## COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO POR RIZÓBIOS EM MUDAS DE ALFACE

KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inés<sup>1</sup>  
ANDREANI JUNIOR, Roberto<sup>2</sup>

---

Recebido em: 2014-05-23

Aprovado em: 2014-01-26

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1108

---

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi relacionar a colonização radicular e/ou da região do colo, avaliada *in vitro*, por estirpes de rizóbios com a capacidade de promoção do crescimento de plântulas de alface. A avaliação da colonização foi realizada visualmente, considerando que a presença de uma névoa turva e esbranquiçada ao longo e em torno da raiz ou do colo da planta, indicava colonização pela bactéria. No experimento em casa de vegetação, foram utilizadas as variedades de alface Americana Delícia, Simpson e Baba de Verão e as estirpes SEMIA 6156 - *Bradyrhizobium* spp, SEMIA 5080 - *B. japonicum*, UCCB001 - *Rhizobium* spp e SEMIA 4077 e SEMIA 4080 - *R. tropici*. Os rizóbios foram aplicados pela bacterização simultânea do substrato e das sementes. Os parâmetros avaliados foram: a altura das plântulas aos 7, 14 e 21 dias após germinação, a fitomassa fresca da parte aérea (FFPA) e das raízes (FFR) aos 21 dias após a germinação. As estirpes SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 colonizaram as raízes das variedades de alface e a estirpe SEMIA 5080 não apresentou colonização. As estirpes UCCB 001, SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 promoveram o crescimento das plântulas de alface, tendo aumentado a altura das mesmas, a fitomassa fresca da parte aérea e da raiz. A estirpe SEMIA 4080 não promoveu o crescimento das plântulas da variedade Baba de Verão.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*. *Rhizobium*. *Bradyrhizobium*. Rizobactérias. Promotoras do crescimento de plantas.

## RHIZOSPHERE COLONIZATION AND GROWTH PROMOTION BY RHIZOBIA SEEDLINGS OF LETTUCE

**SUMMARY:** The aim of this work was to relate the root colonization and/or collar colonization by rhizobia strains, evaluated *in vitro* with the ability of promoting the growth of seedlings of lettuce. The evaluation of colonization was conducted visually, whereas the presence of a hazy and whitish mist along and around the root or around the collar of the plant indicated colonization by the bacterium. In greenhouse experiment, it was used the varieties *Americana Delícia* and *Baba de Verão* and bacterial strains of *Bradyrhizobium* spp SEMIA 6156, *b. japonicum* SEMIA 5080, *Rhizobium* spp. and UCCB001 *r. tropici* Semia 4077 and SEMIA 4080. The rhizobia were applied by simultaneous bacterization of the substrate and seeds. It was evaluated the height of seedlings, the fresh phytomass of the aerial part and of the roots. Root colonization was observed as well as promotion of seed germination by most strains of rhizobia evaluated, except the strain Semia 5080. The strains UCCB001, SEMIA 6156, SEMIA 4077 and of SEMIA 4080 promoted growth of the seedlings of lettuce, having increased their height, the fresh phytomass of the aerial part and of the root. The strain SEMIA 4080 didn't promote growth of seedlings in the variety *Baba de Verão*.

**Keywords:** *Lactuca sativa*. *Rhizobium*. *Bradyrhizobium*. Rhizobacterias. Growth plants promoting.

---

<sup>1</sup> Profa. Titular, Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia, Universidade Camilo Castelo Branco – Unicastelo/campus Fernandópolis, C. Postal 121, 15600-000, Fernandópolis, SP, Brasil doraines@terra.com.br

<sup>2</sup> Prof. Titular da disciplina, Setor de Olericultura, Universidade Camilo Castelo Branco – Unicastelo/campus Fernandópolis, C. Postal 121, 15600-000, Fernandópolis, SP, Brasil. robertoandreani@uol.com.br;

---

## INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais consumidas no Brasil. O êxito do cultivo desta hortaliça depende, em grande parte, da utilização de mudas de alta qualidade. A etapa de produção das mudas é fator determinante para o bom desempenho das plantas nos canteiros de produção, tanto do ponto de vista nutricional, quanto do tempo necessário para a colheita.

Tanto a produção de mudas quanto a produção agrícola, podem estar influenciadas de forma diferente pelos micro-organismos presentes no solo. Dentre os grupos de bactérias mais estudados e de grande potencial para utilização na agricultura encontram-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), representando um variado subgrupo de bactérias que colonizam as raízes, e que promovem o crescimento de plantas associadas a funções não simbióticas. As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal apresentam vários mecanismos que beneficiam o desenvolvimento das plantas. A promoção do crescimento ocorre de forma direta pela produção de fitohormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes, pela fixação de nitrogênio atmosférico ou solubilização do fosfato (ANTOUN *et al.*, 1998), oxidação do enxofre e aumento da permeabilidade das raízes (MARIANO; KLOEPPER, 2000). As rizobactérias podem atuar como agentes de controle biológico de doenças, pela competição por nutrientes com o patógeno, produção de sideróforos e antibióticos (RAMAMOORTHY *et al.*, 2001), e pela resistência induzida (NANDAKUMAR *et al.*, 2001).

Os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). As RPCPs mais estudadas pertencem ao gênero *Pseudomonas*, que além de promover o crescimento, atuam como agentes no controle de várias doenças e pragas (MISKO ; GERMIDA, 2002). Pesquisas mostraram que bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* possuem capacidade de atuar como bactérias promotoras de crescimento em plantas não leguminosas. Estas bactérias produzem ácido indol acético (AIA), fitohormônio que atua na formação de raízes laterais e pêlos radiculares aumentando a absorção de nutrientes (SCHLINDWEIN *et al.*, 2008).

Os benefícios das RPCPs foram observados em diferentes espécies vegetais, dentre as quais plantas anuais, como abóbora (CHEN *et al.*, 2000), beterraba (THRANE *et al.*, 2000), rabanete (LEEMAN *et al.*, 1995), grão de bico e berinjela (KUMAR, 1998), batata e alface (GOMES *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2003; SOTTERO *et al.*, 2006; SCHLINDWEIN *et al.*, 2008).

A resposta das plantas à inoculação com RPCPs é um fenômeno complexo que resulta da combinação de mecanismos que afetam vários aspectos da nutrição mineral, do metabolismo do carbono e do desenvolvimento radicular das plantas (MATELIN ; TORAINE, 2004). As condições ambientais (solo, clima, fertilização, entre outros) e as características dos micro-organismos nativos e introduzidos são fatores determinantes para a sobrevivência e atividade das RPCPs na rizosfera (KOZDROJ *et al.*, 2004). Geralmente é esperado que a resposta das plantas à inoculação com bactérias rizosféricas seja equivalente aos resultados obtidos com a inoculação de leguminosas com rizóbios. As bactérias simbióticas se encontram dentro dos nódulos radiculares, não sofrendo a influência das mudanças do ambiente, enquanto que os micro-organismos rizosféricos colonizam a raiz externamente, sendo afetados pelas condições do meio edáfico (REIS *et al.*, 2004).

A inoculação de sementes com rizóbios é provavelmente a prática agrícola mais difundida, devido à capacidade dessas bactérias fixarem o nitrogênio atmosférico em associação com plantas leguminosas. No entanto, nos últimos anos, tem se verificado que essas bactérias também possuem a capacidade de

atuar como promotoras do crescimento vegetal em não leguminosas (SCHLINDWEIN *et al.*, 2008). O objetivo deste trabalho foi relacionar a colonização radicular e/ou da região do colo, avaliada *in vitro*, por estirpes de rizóbios com a capacidade de promoção do crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.).

## MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em condições de laboratório (Laboratório de Microbiologia) e casa de vegetação da Unicastelo, *Campus* Fernandópolis - SP. Para o desenvolvimento do trabalho foram empregadas as estirpes de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6156, *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, *R. tropici* SEMIA 4080, *B. japonicum* SEMIA 5080, cedidas pela FEPAGRO (Porto Alegre, RS) e *Rhizobium* sp UCCB 001 (isoladas de sementes de soja, Unicastelo) e sementes de alface das cultivares “Americana Delícia”, “Simpson” e “Baba de Verão”, frequentemente utilizadas pelos produtores desta cultura da região de Fernandópolis, SP.

### Avaliação da colonização rizosférica em mudas de alface

Para avaliação da colonização radicular foram utilizadas e adaptadas as metodologias descritas por Silva *et al.* (2003) e Queiroz *et al.* (2006). As sementes de alface foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (2,5%) por um minuto e lavadas, por seis vezes, com água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de filtro e algodão umedecidos e esterilizados. As placas foram mantidas por 24h em câmara de crescimento com temperatura constante de 25°C e no escuro. As sementes germinadas foram colocadas por 10 minutos em suspensões bacterianas contendo uma das estirpes de rizóbio na concentração de  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colônias) mL<sup>-1</sup>. As suspensões bacterianas foram preparadas em meio líquido de extrato de levedura – manitol (YMB), incubadas a 28°C por 72 horas e sob agitação orbital (125 rpm). As sementes germinadas utilizadas para o tratamento controle sem inoculação foram colocadas em meio de cultura YMB estéril por 10 minutos. Após inoculação, cada semente foi depositada em tubo de ensaio contendo ágar-água (0,8%) esterilizado e o experimento foi mantido em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz a 25°C, por 3 dias. A ausência de qualquer fonte de carbono disponível no ágar-água proporciona uma seleção de rizobactérias com capacidade de utilização dos exsudatos radiculares, permitindo, assim, selecionar aquelas que são atraídas e/ou que metabolizam os exsudatos radiculares (QUEIROZ *et al.*, 2006). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições para cada tratamento.

A avaliação da colonização radicular foi realizada visualmente. Foram consideradas colonizadas as plântulas que apresentaram uma névoa turva, de aspecto esbranquiçado em torno da raiz ou na região do colo. Os resultados foram considerados positivos, quando se verificou crescimento bacteriano em todos os tubos; e negativos, quando houve ausência de crescimento e colonização parcial, quando o crescimento foi registrado em três ou quatro tubos (SOTERO *et al.*, 2006).

### Promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface

Para avaliar a promoção do crescimento em mudas de alface pelas estirpes de rizóbios, o experimento foi conduzido em casa de vegetação durante 21 dias, e as suspensões bacterianas foram preparadas nas mesmas condições de cultivo e de concentração bacteriana, empregadas para o experimento de colonização radicular. Foi empregada a bacterização simultânea de sementes e substrato, de acordo com metodologia descrita por Gomes *et al.* (2003), sendo depositado 8 mL da suspensão

bacteriana sobre cada semente contida na superfície do substrato (Plantmax<sup>®</sup>), em cada célula da bandeja de poliestireno. A testemunha sem inoculação recebeu a mesma quantidade em volume (8 mL) de meio YMB esterilizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo a unidade experimental representada por 30 plantas. A irrigação das bandejas foi realizada com água destilada diariamente com a finalidade de manter o substrato sempre úmido.

Semanalmente, foi avaliada a altura das plântulas e aos 21 dias, após germinação, foram avaliadas a fitomassa fresca das raízes (FFR) e da parte aérea (FFPA).

Os dados obtidos foram avaliados quanto a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

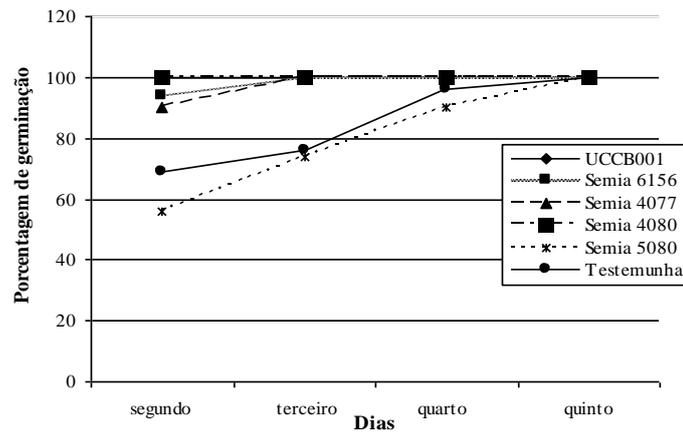
## RESULTADO E DISCUSSÃO

Das estirpes de rizóbios estudadas, somente SEMIA 6156 e SEMIA 4077 colonizaram as plântulas das três cultivares na região do colo e ao longo das raízes. A estirpe SEMIA 4080 apresentou colonização total das raízes e do colo nas cultivares Americana Delícia e Simpson, e na cultivar Baba de Verão a colonização foi limitada à região do colo. A estirpe UCCB 001 colonizou somente as raízes das três cultivares e a estirpe SEMIA 5080 e não colonizou nem o sistema radicular nem a região do colo, observando-se a mesma característica nas plantas sem inoculação. Estes resultados mostraram que as bactérias utilizadas apresentaram formas diferentes de colonização rizosférica nas plantas de alface. Sotero *et al.* (2006) também observaram diferenças na colonização radicular por bactérias. Alguns isolados, avaliados por estes autores, colonizaram parcialmente o sistema radicular de plantas de alface ou unicamente na região do colo, enquanto outros isolados bacterianos colonizaram totalmente o sistema radicular e a região do colo, indicando que as bactérias apresentam capacidades de colonização diferentes.

As diferenças quanto aos sítios de colonização verificadas neste trabalho, provavelmente, estão associadas à dependência das bactérias à provisão de exsudatos pelas plantas de alface, indicando que as raízes não possuem uma ilimitada capacidade de carga bacteriana e que qualquer mudança no sistema da planta pode afetar esta capacidade (SAHIN *et al.*, 2004). Como o experimento foi desenvolvido em substrato de ágar e água, as bactérias que se desenvolveram e colonizaram a raiz e/ou a região do colo receberam a fonte de carbono dos exsudatos radiculares liberados no meio pelas plântulas de alface, mostrando que houve interação entre as plantas e as estirpes bacterianas empregadas. Esta interação não foi observada entre a estirpe *B. japonicum* – SEMIA 5080, que não apresentou colonização rizosférica devido, provavelmente, a não utilização, como fonte de carbono, dos exsudatos liberados pelas plântulas de alface. As bactérias rizosféricas conseguem sobreviver quando são capazes de utilizar os exsudatos das plantas ou quando são quimiostaticamente atraídas, e o estabelecimento do micro-organismo na rizosfera garante sua interação com a planta de forma benéfica ou prejudicial (HABE; UESUGI, 2000).

A utilização das estirpes UCCB 001 - *Rhizobium sp.*, SEMIA 6156 - *Bradyrhizobium sp.*, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 de *R. tropici* na inoculação das sementes de alface resultou em aumento da uniformidade de germinação, quando comparadas com a testemunha que recebeu o mesmo volume de meio de cultura e com o tratamento com a estirpe *Semia 5080 B. japonicum* que apresentaram desuniformidade germinativa (Figura 1).

**Figura 1-** Porcentagem de germinação de sementes de alface, variedades Americana Delicia, Simpson e Baba de Verão, não bacterizadas e bacterizadas com estirpes de rizóbios UCCB001, SSEMIA 6156, SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 5080.



Provavelmente, estes resultados estão relacionados com os metabólitos secundários liberados pelas bactérias no meio, podendo estar envolvidos uma variedade de processos ecológicos, devido a presença de substâncias promotoras do crescimento vegetal, tais como: fitohormônios, sideróforos, antibióticos, entre outros (DIAS ; DIAS, 2007, COELHO et al., 2008). O aumento da velocidade e da porcentagem de germinação, verificadas no presente trabalho, poderiam estar associados à presença de fitohormônios liberados pelas estirpes no meio de cultura. Segundo Schlindwein et al. (2008), o ácido indol acético (AIA) produzido por bactérias rizosféricas influencia os parâmetros de germinação de sementes de alface. Estes autores afirmam que a taxa de germinação e o vigor das plântulas dependem tanto de fatores genéticos inerentes à semente quanto às práticas culturais que podem alterá-las. Dentre as práticas culturais, a inoculação de sementes com micr-organismos benéficos é uma alternativa que permite o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Nos três grupos de alface o desenvolvimento das mudas foi superior nos tratamentos inoculados com as estirpes UCCB001, SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080. Ao avaliar a promoção do crescimento pelos rizóbios utilizando como parâmetro a altura das plântulas, verificou-se que a maioria apresentou efeito positivo sobre o desenvolvimento das mudas de alface (Tabela 1). No entanto, na primeira semana, as plântulas da variedade Americana Delícia, inoculadas com as estirpes de UCCB001 e SEMIA 5080 apresentaram valores de altura menores em relação àquelas inoculadas com SEMIA 4080. Neste mesmo período verificou-se que a estirpe SEMIA 4080 não promoveu o crescimento das plântulas de alface da variedade Baba de Verão, diferindo estatisticamente inclusive da testemunha não inoculada.

**Tabela 1-** Avaliação do desenvolvimento das mudas de três variedades de alface inoculadas e não inoculadas com estirpes de rizóbios.

(Continua)

Tratamentos	Altura de plantas (cm)					
	Primeira Semana					
	Testemunha	UCCB 001	SEMIA 6156	SEMIA 4077	SEMIA 4080	SEMIA 5080
Americana Delicia	3,5 bc A	3,9 b A	4,2 ab A	4,4 ab A	5,1 a A	3,9 b A
Simpson	3,4 ab A	3,9 a A	4,0 a A	4,2 a A	4,2 a B	3,4 ab A
Baba de Verão	3,5 b A	3,8 ab A	4,2 a A	4,3 a A	2,6 c C	3,8 ab A
C.V. (%)	4,7	5,6	7,5	5,6	8,2	7,6

**Tabela 1-** Avaliação do desenvolvimento das mudas de três variedades de alface inoculadas e não inoculadas com estirpes de rizóbios.

<b>(Conclusão)</b>						
Altura de plantas (cm)						
Tratamentos	Segunda Semana					
	Testemunha	UCCB001	SEMIA 6156	SEMIA 4077	SEMIA 4080	SEMIA 5080
Americana Delicia	5,0 b A	5,6 ab A	5,9 a A	5,5 ab A	6,6 a A	5,1 b A
Simpson	4,8 b A	5,4 a A	5,6 a A	5,5 a A	5,6 a B	4,3 b A
Baba de Verão	4,8 b A	5,2 a A	5,9 a A	5,5 <sup>a</sup> A	4,5 b C	4,4 b A
C.V. (%)	5,3	7,8	9,9	6,5	6,7	7,7
Tratamentos	Terceira Semana					
	Testemunha	UCCB 001	SEMIA 6156	SEMIA 4077	SEMIA 4080	SEMIA 5080
Americana Delicia	7,5 b A	7,9 ab A	8,2 a A	7,9 ab A	9,0 a A	7,6 b A
Simpson	7,1 b A	7,7 ab A	7,9 a A	8,0 a A	8,0 a B	7,0 b A
Baba de Verão	7,2 b A	7,7 ab A	8,1 a A	8,2 a A	6,9 b C	7,0 b A
C.V. (%)	5,5	7,1	8,6	7,7	8,4	9,3

As avaliações realizadas na segunda e terceira semana, demonstraram que todas as estirpes promoveram o crescimento das mudas de alface das três variedades, exceto as estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 4080, sendo esta última ineficiente na variedade Baba de Verão. Contudo, foi possível verificar que houve interação entre as três variedades unicamente quando as sementes foram inoculadas com *R. tropici* SEMIA 4080 (Tabela 1). O efeito superior na cultivar Americana Delicia por esta estirpe de rizóbio está associada à capacidade de colonização, ou a uma provável especificidade cepa-hospedeiro. Gomes *et al.* (2003) observaram que isolados de couve foram capazes de colonizar, com maior intensidade, raízes de alface favorecendo o desenvolvimento das mudas. As variações na colonização das raízes pelas rizobactérias em condições controladas, também podem ser atribuídas à umidade do substrato, (REIS JUNIOR *et al.*, 2004); distribuição das bactérias sobre a raiz, sendo que as zonas de maior crescimento produzem mais exsudatos favorecendo a colonização (FISCHER *et al.*, 2000); a especificidade cepa-hospedeiro (SHULZE ; POSCHEL, 2004); e competitividade com as bactérias nativas (SAUBIDET *et al.*, 2002).

Ao avaliar a fitomassa fresca da parte aérea se verificou incremento significativo nas mudas de alface inoculadas com as estirpes UCCB 001, SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 (Tabela 2).

**Tabela 2-** Avaliação da Fitomassa Fresca de Parte Aérea de plântulas de alface inoculadas e não inoculadas com estirpes de rizóbios.

Tratamentos	Fitomassa Fresca da Parte Aérea (FFPA, mg)					
	Testemunha	UCCB 001	SEMIA 6156	SEMIA 4077	SEMIA 4080	SEMIA 5080
Americana Delicia	80 b A	110 a A	110 a A	160 a A	170 a A	60 bc A
Simpson	60 b A	100 a A	90 ab A	150 a A	180 a A	50 b A
Baba de Verão	80 b A	120 a A	110 a A	130 a A	80 b B	90 b A
C.V. (%)	9,9	10,1	8,8	4,8	7,8	9,2

Resultados semelhantes foram obtidos por Peña ; Reyes (2007) em estudos realizados em alface utilizando culturas de rizóbios obtidas de nódulos de feijão. Estes autores verificaram incremento da fitomassa das plântulas quando foram utilizados inóculos de bactérias em forma isolada ou consorciada.

No entanto, verificou-se que a estirpe SEMIA 4080 não promoveu o crescimento das mudas de alface da variedade Baba de Verão, já a estirpe SEMIA 5080 foi ineficiente nas três variedades (Tabela 2).

Em relação ao sistema radicular, a utilização das estirpes UCCB001, SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 resultou em aumento do desenvolvimento das raízes, na maioria das mudas (Tabela 3), aumentando a superfície de absorção, permitindo assim maior assimilação de água e nutrientes, favorecendo o desenvolvimento da parte aérea. A variedade Baba de Verão não apresentou resposta à inoculação com SEMIA 4080 e SEMIA 5080. Esta última estirpe não foi eficiente também nas variedades Americana Delicia e Simpson, apresentando valores de fitomassa semelhantes aos das mudas não bacterizadas.

**Tabela 3-** Avaliação da Fitomassa Fresca das Raízes de plântulas de alface inoculadas e não inoculadas com estirpes de rizóbios.

Tratamentos	Fitomassa Fresca da Raiz (FFR, g)					
	Testemunha	UCCB 001	SEMIA 6156	SEMIA 4077	SEMIA 4080	SEMIA 5080
Americana Delicia	80 b A	113 a A	118 a A	140 a A	160 a A	70 b A
Simpson	90 b A	100 a A	100 a A	130 a A	150 a A	90 b A
Baba de Verão	80 b A	110 a A	110 a A	130 a A	70 b B	70 b A
C.V. (%)	10,5	11	10,2	8,5	8,7	12

O comportamento da estirpe 5080 e da testemunha foi semelhante em relação aos parâmetros avaliados nas três variedades de alface, provavelmente, por estas bactérias não colonizarem nem a raiz nem a região do colo.

Em relação à SEMIA 4080, que colonizou totalmente as raízes e a região do colo da variedade Baba de Verão, constatou-se que esta estirpe induziu a germinação das sementes (Figura 1), mas não promoveu um bom desenvolvimento das mudas quando comparadas com as estirpes UCCB001, SEMIA 6156 e SEMIA 4080. Em função dos resultados obtidos neste trabalho é possível afirmar que a colonização total da raiz e da região do colo, in vitro, nem sempre pode ser considerada um método de avaliação eficiente para definir a capacidade de promoção do crescimento vegetal por uma determinada estirpe bacteriana. Sotero et al. (2006) verificaram que um isolado que não exibiu colonização radicular e do colo, aumentou significativamente o número de folhas das plântulas de alface. Segundo estes autores, a ausência de colonização pode indicar que o método utilizado para avaliação testado pode ter limitações ou, ainda, que o isolado poderia ser um colonizador endofítico, situação em que a sua presença não seria detectada externamente, podendo ser eficientes promotoras do crescimento. A estirpe SEMIA 5080 não apresentou comportamento de bactéria endofítica pelo fato de não ter sido observado efeito positivo quanto ao desenvolvimento das mudas.

O êxito da inoculação com rizobactérias depende da capacidade das cepas para competir com a microflora nativa. As bactérias do inoculante se estabelecem quando são capazes de competir por nutrientes com a microflora livre do solo para sobreviver e de proliferar antes que se forme a raiz e, depois de colonizar a raiz, devem competir com as bactérias rizosféricas pelos exsudatos (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001; KOZDROJ et al., 2004). Levando em consideração o desenvolvimento das mudas, pode se afirmar que as estirpes de rizóbios SEMIA 6156, SEMIA 4077 e SEMIA 4080, utilizadas neste experimento foram mais competitivas que as bactérias presentes no substrato.

Para a produção de alface, sabe-se que devem ser levadas em consideração as *fases iniciais do desenvolvimento das mudas por serem cruciais no ciclo de vida da planta, uma vez que, entre a germinação da semente e o estabelecimento da plântula ocorrem as maiores taxas de mortalidade. Além disso, o vigor da plântula é um fator crítico* quando a competição por luz, nutrientes, ar e água começa a se tornar mais acentuada. Assim, a qualidade fisiológica das sementes e do vigor das plântulas são fatores decisivos no sucesso produtivo de uma determinada cultura (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Neste estudo, demonstrou-se a potencialidade das estirpes de *Bradyrhizobium* spp SEMIA 6156, *Rhizobium* spp UCCB001 e *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 como promotoras do crescimento para as três variedades de alface avaliadas. Já a estirpe de *R. tropici* SEMIA 4080 poderia ser utilizada na produção de mudas das variedades Americana Delícia e Simpson. Assim, é possível afirmar que as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) apresentam grande potencial para utilização na agricultura, representando um variado subgrupo de bactérias que colonizam as raízes. O estudo desses micro-organismos vem merecendo destaque nos últimos anos, devido à grande demanda por tecnologias que viabilizem uma agricultura sustentável e que futuramente, uma percentagem maior destas bactérias seja usada na produção de alimentos provenientes, principalmente, do cultivo orgânico.

## REFERÊNCIAS

- ANTOUN, H. et al. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* as specie plant growth promoting rhizobacterian on non-legume: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p.57-67. 1998.
- BACILIO-JIMENEZ, M.et al. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemical**, v. 33, p.167-172. 2001.
- CHEN, C.et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *pythium sphsniidermstum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p.13-23. 2000.
- COELHO, L.F.et al. Diversity of fluorescent pseudomonads in different rhizospheres. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.4, p.901-907. 2008.
- DIAS, L.S.; DIAS, A.S. Metabolitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, p.510-517. 2007.
- FISCHER, S.; RIVAROLA, V.; MORI, G. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* is impaired by saline stess. **Plant and soil**, v. 225, p.187-191. 2000.
- FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p.61-70. 2003.
- GOMES, A.M.A.et al. Isolamento e seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p.699-703. 2003.
- HABE, M.H.; UESUGI, C.H. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias de raízes do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p.657-660. 2000.
- KOZDROJ, J.; TREVOS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. Influence of introduced potencial biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p.1775-1784. 2004.

- KUMAR, B.S.D. Disease suppression and crop improvement through fluorescent pseudomonads isolated from cultivated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p.735-741. 1998.
- LEEMAN, S. et al. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v. 86, p.149-155. 1995.
- MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p.121-137. 2000.
- MATELIN, S.; TORAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on roots development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p.27-34. 2004.
- MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p.399-407. 2002.
- NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p.603-612. 2001.
- PEÑA, H.B.; REYES, I. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Interciencia**, v. 32, p.560-565. 2007.
- QUEIROZ, B.P.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.; IMELOI, S. Visualização *in vitro* da colonização por rizobactérias. **Summa Phytopathology**, v. 32, p.95-97. 2006.
- RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p.1-20. 2001.
- REIS JUNIOR, F.B. et al. Identification of *Azospirillum amazonense* isolated to *Brachiaria* spp at different stages and growth conditions and bacterial plants hormone production. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p.103-113, 2004.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p.310-339. 1999.
- SAUBIDET, M.; FATTA, N.; BARNEIX, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, p.215-222. 2002.
- SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yield in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, v. 265, p.123-129. 2004.
- SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v. 38, p.658-664. 2008.
- SCHULZE, J.; POLSCHEL, G. Bacterial inoculation of maize affects carbon allocation to roots and carbon allocation to roots turnover in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 267, p.235-241. 2004.
- SILVA, H.A.S.; ROMEIRO, R.S.; MOUNTEER, A. Development of root colonization bioassay for rapid screening rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p.42-46. 2003.
- SOTTERO, N.A. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p.225-234. 2006.
- THRANE, C. et al. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p.139-146. 2000.

