



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbcs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo  
Brasil

Sottero, Adriana Nanô; dos Santos Freitas, Sueli; Melo, Arlete Marchi Tavares de; Trani, Paulo  
Espíndola

Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 30, núm. 2, 2006, pp. 225-234

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214051004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

### RIZOBACTÉRIAS E ALFACE: COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE BIOLÓGICO<sup>(1)</sup>

Adriana Nanô Sottero<sup>(2,3)</sup>, Sueli dos Santos Freitas<sup>(4)</sup>, Arlete Marchi  
Tavares de Melo<sup>(4)</sup> & Paulo Espíndola Trani<sup>(4)</sup>

#### RESUMO

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) podem aumentar a produção agrícola de diversas culturas. O objetivo deste trabalho foi relacionar a colonização radicular e, ou, do colo de plântulas por RPCPs, avaliada *in vitro*, com sua capacidade de promoção do crescimento, de maneira a agilizar os testes de seleção de isolados de rizobactérias. Além disso, testou-se o antagonismo *in vitro* entre as bactérias e o fungo *Fusarium* sp., para verificar a possibilidade de ser a promoção do crescimento exercida por controle biológico de fitopatógeno. Avaliaram-se 64 isolados de rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp., de diversas origens. A avaliação foi feita visualmente, considerando-se que a presença de uma névoa turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz ou de névoa em volta do colo da plântula indicava a colonização das raízes pela bactéria. De todos os isolados bacterianos, apenas oito resultaram em névoa ao longo das raízes e trinta e oito colonizaram a região do colo. Desenvolveu-se também um experimento em casa de vegetação para verificar a capacidade desses isolados de promover crescimento em plantas de alface. O substrato utilizado foi formado por uma mistura de solo e esterco de galinha, semelhante ao usado pelos produtores. Doze isolados promoveram o crescimento das plantas, tendo quatro aumentado a massa de matéria seca da raiz e nove, o número de folhas. Onze isolados que promoveram o crescimento das plantas de alface apresentaram colonização radicular na região do colo. No teste de antagonismo *in vitro* em meio B de King e em meio BDA, doze dos sessenta e quatro isolados avaliados apresentaram antagonismo contra *Fusarium* sp., e, desses, apenas três foram eficientes na promoção de crescimento de plantas de alface, tendo colonizado a região do colo das plântulas.

Termos de indexação: *Pseudomonas*, RPCPs, *Fusarium* sp.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado da primeira autora, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical do Instituto Agrônomo – IAC. Recebido para publicação abril de 2003 em e aprovado em março de 2006.

<sup>(2)</sup> Bióloga, Mestranda do Instituto Agrônomo – IAC. Caixa Postal 28, CEP 13001-970 Campinas (SP).

<sup>(3)</sup> Bolsista da FUNDAG.

<sup>(4)</sup> Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo, IAC. E-mail: sfreitas@iac.sp.gov.br

## SUMMARY: RHIZOBACTERIA AND LETTUCE: ROOT COLONIZATION, PLANT GROWTH PROMOTION AND BIOLOGICAL CONTROL

*Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can increase the productivity of several crops, including lettuce. The main objective of this study was to compare the root and/or root collar colonizing ability on the growth promotion ability. A method of evaluation of root colonization was tested with the main objective of speeding up screening trials for growth enhancement of lettuce. Additionally, the antagonism in vitro between rhizobacteria and the pathogen Fusarium sp. was tested to verify if growth promotion ability was determined by biological control. Sixty-four bacterial isolates of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of different lettuce varieties were tested in vitro to verify their capability of colonizing lettuce roots. The presence of a turbid, milky and narrow fog around the root zone indicated bacteria colonization. Only eight isolates colonized the root system, and thirty-eight did in the root collar region, as could be evaluated by visual means. A greenhouse trial was then carried out to verify the growth promotion capacity of the isolates in lettuce. The substrate was a mixture of soil and chicken manure, similar to the one used by producers. Twelve isolates promoted growth of plants. Among those, four increased root dry weight, nine enhanced the number of leaves and eleven colonized the root collar. The antagonism assay was performed in PDA medium and King's B medium. Although twelve isolates showed antagonistic activity against Fusarium sp., only three of them enhanced growth in lettuce and colonized the root collar.*

*Index terms: Pseudomonas, PGPR, Fusarium sp.*

## INTRODUÇÃO

Os benefícios causados pelas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) podem ser verificados em diversas culturas, dentre as quais se destaca a alface (Freitas et al., 2003). A promoção de crescimento pode ser o resultado de diversos mecanismos, a saber: controle biológico pela competição por nutrientes com o patógeno, produção de sideróforos e antibióticos (Kloepper et al., 1980; Ramamoorthy et al., 2001), resistência induzida a doenças (Nandakumar et al., 2001), promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de N<sub>2</sub> (Antoun et al., 1998) ou solubilização de P (Chabot et al., 1996). Daí, o interesse por suas funções na rizosfera ter aumentado significativamente nas últimas décadas (Chabot et al., 1996; Gasoni et al., 2001; Freitas et al., 2003).

Na cultura da alface, já se observaram, em condições de campo, aumentos significativos na matéria fresca, quando as sementes foram tratadas com *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus* (Gasoni et al., 2001). Isolados de *Bacillus cereus* e de *Pseudomonas* sp. foram eficientes no controle biológico do nematóide *Meloidogyne incognita*, quando inoculados em sementes de alface e tomate (Hoffmann-Hergarten et al., 1998). Microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, também já foram relatados na promoção de crescimento em alface e milho, tendo gerado aumentos na absorção de fosfato da ordem de 6 e 8 %, respectivamente (Chabot et al., 1996).

Há relatos, na literatura, sobre isolados de *Pseudomonas* fluorescentes que apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Pythium* spp., *Botrytis cinerea*, *Phytophthora nicotianae* e *Fusarium oxysporum* (Freitas & Pizzinatto, 1991; Sarathchandra et al., 1993). Ainda que os testes de antagonismo *in vitro* nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo* (Freitas & Pizzinatto, 1991), permitem uma primeira seleção de um grande número de isolados num curto espaço de tempo (Lucon & Melo, 1999). Os testes *in vitro*, é claro, ocorrem em condições muito diferentes das naturais, o que constitui a explicação mais fácil para a ausência de correlação com os testes *in vivo*. Todavia, Freitas & Pizzinatto (1997) relataram diversos isolados tanto de *Pseudomonas* spp. quanto de *Bacillus* spp. que diminuíram a incidência de *Colletotrichum gossypii* em sementes de algodoeiro, numa avaliação realizada em laboratório, em caixas “gerbox”, na presença e ausência do patógeno, quando se avaliaram a percentagem de emergência e a ocorrência de necrose no colo.

O estabelecimento bacteriano na rizosfera é fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. A inconstância dos resultados é um assunto bastante citado por diversos autores, pois nem sempre as rizobactérias repetem sua atuação como promotoras de crescimento, mesmo em testes realizados em condições semelhantes (Chanway et al., 2000; Freitas et al., 2003). Um dos problemas seria o fato de que os microrganismos introduzidos nem sempre são capazes de se mover do local de inoculação, a semente, para se estabelecerem efetivamente na

rizosfera e no rizoplano; um dos fatores responsáveis por essa incapacidade seriam as condições ambientais, conforme sugerido por Suslow (1982). Outra hipótese seria ligada aos casos em que a promoção do crescimento é por controle biológico de patógenos menores, isto é, aqueles que não causam sintomas muito claros de doenças, apenas deprimem o crescimento da planta como um todo. Nesses casos, se esses patógenos não estiverem presentes no solo, eventualmente, não haverá promoção de crescimento (Weller & Zablotowicz, 1987). Também os fatores nutricionais do solo podem ser limitantes na competição entre bactérias, podendo resultar em ausência de colonização radicular: Freitas et al. (2003) obtiveram diferentes respostas quando isolados de *Pseudomonas* sp. foram submetidos a diferentes substratos com diferentes concentrações de nutrientes.

O objetivo deste trabalho foi relacionar a colonização radicular e, ou, do colo de plântulas por RPCPs, avaliada *in vitro*, com sua capacidade de promoção do crescimento, com vistas em agilizar os

testes de seleção de isolados de rizobactérias. Além disso, testou-se o antagonismo *in vitro* entre as bactérias e o fungo *Fusarium* sp., para verificar a possibilidade de ser a promoção do crescimento exercida por controle biológico de fitopatógeno.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos isolados bacterianos

Dos isolados utilizados, parte foi proveniente da coleção de RPCPs do Instituto Agrônomo (Freitas et al., 2003), parte foi obtida da maneira descrita abaixo (Quadro 1). Os obtidos por Freitas (1994) provieram da rizosfera de algodoeiro, milho, soja, pimentão, citros, couve e solo solarizado, além de alface. Os isolados obtidos neste trabalho provieram todos da rizosfera de alface, podendo-se observar as indicações dos locais em que foram obtidas as plantas das duas variedades a partir das quais se fizeram os isolamentos (Quadro 1).

**Quadro 1. Origem dos isolados de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas***

Isolado	Origem	Isolado	Origem
Ps 21A <sup>(1)</sup>	Rizosfera de algodoeiro	Ps 859	Rizosfera de alface
Ps 31B <sup>(1)</sup>	Rizosfera de milho	Ps 860	Cultivar Gizele (Santa Genebra)
Ps 41A <sup>(1)</sup>	Rizosfera de soja	Ps 861A	
Ps 42B <sup>(1)</sup>		Ps 861B	
Ps 43B <sup>(1)</sup>		Ps 862A	
Ps 44B <sup>(1)</sup>		Ps 862B	
Ps 70 <sup>(1)</sup>	Rizosfera de citros	Ps 863	Rizosfera de alface
Ps 80 <sup>(1)</sup>	Rizosfera de couve	Ps 864A	Cultivar Gizele (Parque Ceasa)
Ps 85 <sup>(1)</sup>	Rizosfera de alface	Ps 864B	
Ps 91 <sup>(1)</sup>	Rizosfera de pimentão	Ps 864C	
Ps 92 <sup>(1)</sup>		Ps 865A	
Ps 221 <sup>(1)</sup>	Solo solarizado	Ps 865B	
Ps 851A	Rizosfera de alface	Ps 865C	
Ps 851B	Cultivar Vera (São Benedito)	Ps 865D	
Ps 851C		Ps 866A	
Ps 851D		Ps 866B	
Ps 852A		Ps 867	
Ps 852B		Ps 868	
Ps 852C		Ps 869A	Rizosfera de alface
Ps 852D		Ps 869C	Cultivar Vera (São Marcos)
Ps 853A		Ps 869D	
Ps 853B		Ps 870A	
Ps 854A		Ps 870B	
Ps 854B		Ps 870C	
Ps 855B		Ps 871A	
Ps 855C		Ps 871B	
Ps 856A		Ps 871C	
Ps 856B		Ps 872	
Ps 857A	Rizosfera de alface	Ps 873A	
Ps 857B	Cultivar Gizele (Santa Genebra)	Ps 873C	
Ps 857C		Ps 873D	
Ps 858		Ps 874	

<sup>(1)</sup> Isolados obtidos por Freitas (1994).

Para o isolamento, amostraram-se solos rizosféricos de dois cultivares de alface ('Vera' e 'Gizele') de quatro produtores da cidade de Campinas, cujas propriedades foram denominadas Parque Ceasa, Santa Genebra, São Benedito e São Marcos. Todas as propriedades apresentam uma área aproximada de um hectare e as atividades caracterizam-se pela agricultura familiar. De maneira geral, o solo das propriedades tinha características de solo orgânico, provavelmente pela contínua adição de adubos e compostos orgânicos, prática adotada pelos produtores de hortaliças.

As raízes das plantas foram agitadas, para soltar o solo mais frouxamente a elas aderido, cortadas e colocadas em 100 mL de solução esterilizada de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  em frasco tampado. A seguir, agitou-se o frasco por 20 min. Dessa maneira, o solo que ainda ficara aderido às raízes soltou-se delas. Prepararam-se diluições seriadas, de fator 10, da suspensão de solo, obtida, em solução de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . Posteriormente, espalhou-se 0,1 mL das diluições desejadas com auxílio da alça de Drigalski em placas com meio B de King et al. (1954) com vistas em obter isolados de bactérias fluorescentes. As placas foram mantidas em temperatura de 28–30 °C por período suficiente para se observar o crescimento das colônias. As colônias fluorescentes sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta foram isoladas como pertencentes ao grupo de *Pseudomonas* sp. (Stanier et al., 1966).

#### Avaliação da colonização radicular

As sementes de alfaves utilizadas foram do cultivar 'Brasil 221' que faz parte do germoplasma do Instituto Agrônômico (IAC). Foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % por um minuto e, depois, lavadas com um litro de água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com algodão e papel de filtro umedecido. As placas foram embrulhadas com papel alumínio para que a germinação ocorresse no escuro.

Depois de 24 h, as sementes germinadas foram colocadas em suspensões bacterianas correspondentes aos tratamentos de inoculação por 10 min, secas em papel de filtro e, a seguir, colocadas em tubos de ensaio – uma semente por tubo – contendo ágar-água, com 0,6 % de ágar, com cinco repetições de cada tratamento.

A observação da colonização radicular foi feita visualmente, de acordo com o método de Silva et al. (2003). Cerca de dois dias depois, as plântulas que apresentavam uma névoa turva, de aspecto esbranquiçado, ao longo e em volta da raiz (Silva et al., 2003) ou na região do colo, foram consideradas colonizadas. Para o registro desses resultados, considerou-se, como positivo, o crescimento em quatro ou cinco dos tubos de ensaio e, como negativo,

a ausência do crescimento em quatro ou cinco dos tubos. Registrou-se como colonização parcial quando houve crescimento em dois ou três tubos. A região ao longo e em volta da raiz foi denominada sistema radicular, neste trabalho, para facilidade de expressão. As duas formas de presença da névoa – em todo o sistema radicular ou apenas na região do colo – foram registradas em separado, para verificar se a colonização da região do colo já indicaria a possibilidade de interação da bactéria com a planta ou se, para ocorrer alguma interação, seria necessária a presença da bactéria em todo o sistema radicular da plântula.

Em seguida, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio com ágar, o sistema radicular foi separado da parte aérea 2 cm abaixo do colo e colocado em meio B de King et al. (1954) para observar fluorescência após um período de 24 a 48 h. A ocorrência de fluorescência no meio de cultura confirmava a presença de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas*. As plântulas com névoa apenas na região do colo tiveram seu sistema radicular cortado a partir dessa região.

#### Promoção de crescimento

Para avaliar a promoção do crescimento pelos mesmos isolados de rizobactérias utilizados no item anterior, foi realizado um experimento com alface cultivar 'Brasil 221' em vasos com 0,5 L do substrato usado pelos produtores de mudas mantidos em casa de vegetação, com cinco repetições, em delineamento experimental inteiramente casualizado. O substrato foi uma mistura de Latossolo Vermelho distrófico típico com esterco de galinha, à razão de 10:1 em volume. A análise do substrato mostrou os seguintes valores: M.O. (g  $\text{dm}^{-3}$ ) 28; em  $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$ : K, 0,9;  $\text{Ca}^{2+}$ , 335;  $\text{Mg}^{2+}$ , 40; H + Al, 13; soma de bases, 384,9; pH em  $\text{CaCl}_2$ , 6,9; V, em %: 97.

Antes da semeadura, as sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2,5 % por um minuto e depois secas em papel de filtro esterilizado, em câmara de fluxo laminar. Foram colocadas quatro sementes por vaso. Dois dias após o plantio, as sementes receberam a suspensão de inóculo bacteriano. Para o preparo dessa suspensão, primeiramente os isolados bacterianos foram mantidos em tubos de ensaio com meio B inclinado, por 24 h, a 30 °C. Em seguida, o crescimento bacteriano da superfície dos tubos foi raspado com alça de platina, e o material obtido foi transferido para frascos de Erlenmeyer com 100 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . Esse procedimento resultou em suspensões com aproximadamente  $10^8$  UFCs  $\text{mL}^{-1}$ . A testemunha sem inoculação recebeu a mesma quantidade em volume – 8 mL – da solução esterilizada de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . Catorze dias após a primeira inoculação, as bactérias foram reinoculadas, como já descrito anteriormente. A irrigação foi feita com água de torneira sempre que necessário.



O desbaste foi efetuado no 25º dia, ficando somente uma planta por vaso. No 37º dia, cada vaso recebeu um grama de nitrocálcio para fornecer N às plantas. Cinquenta e seis dias após a semeadura, realizou-se a colheita, pelo corte da parte aérea e retirada das raízes, com jatos d'água abundantes, de modo a recuperar o máximo possível do sistema radicular. Após a colheita, avaliou-se a matéria seca da parte aérea e da raiz.

#### Teste de antagonismo *in vitro*

Procedeu-se ao isolamento de possíveis patógenos existentes no solo do experimento anterior. Foram amostrados 10 g de solo sem e com esterco, ambos sem inoculação de bactéria, e colocados em 90 mL de solução esterilizada de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em frasco tampado. Agitou-se o frasco por 20 min. A seguir, prepararam-se diluições de fator 10 dessa suspensão de solo em solução de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  até à diluição  $10^{-5}$ . Posteriormente, espalhou-se 0,1 mL das diluições em placas de Petri que continham meio de Martin (Tuite, 1969) em duplicata. As placas foram mantidas em  $28^\circ\text{C}$  por período suficiente para se observar o crescimento do fungo. Os fungos que se apresentavam em colônias puras foram transferidos para tubos inclinados que continham meio BDA.

O único fungo potencialmente patogênico assim isolado, *Fusarium* sp., foi confrontado com os 64 isolados bacterianos, para verificar a ocorrência de antagonismo *in vitro*. Cilindros com crescimento fúngico em meio de cultura, com 3 mm de diâmetro, foram transferidos para o centro das placas de Petri em meio B de King et al. (1954) e em meio BDA. As placas foram mantidas em  $28^\circ\text{C}$  por 48 h. As bactérias, em meio B de King, foram mantidas em crescimento por 24 h a  $28^\circ\text{C}$  e, em seguida, transferidas com alça de platina para quatro pontos equidistantes entre si e do centro da placa, que já continha o fungo. O crescimento fúngico, antes da inoculação bacteriana, apresentava 3 cm de diâmetro. As placas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições, avaliando-se a ocorrência de antagonismo após 24 h e, novamente, após 48 h. A avaliação da ocorrência de antagonismo foi feita visualmente, pelo confronto entre placas com ambos os organismos e placas-controle, apenas com a colônia do fungo. Avaliou-se o crescimento fúngico nas proximidades das colônias bacterianas, por meio de observações das características do crescimento dos microrganismos e comparação com as placas-controle.

#### Análises estatísticas

Os dados de massa de matéria seca da parte aérea, de raízes e total e o número de folhas de alface foram submetidos à análise de variância pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste unilateral de Dunnett, a 5 %.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da colonização radicular

Dos isolados estudados, apenas oito – Ps 31B, Ps 852A, Ps 852B, Ps 864B, Ps 870C, Ps 871A, Ps 873A e Ps 873C – colonizaram a plântula de alface ao longo das raízes e 38 a região do colo (Quadro 2). Os oito isolados que colonizaram totalmente o sistema radicular – 12 % do total de isolados – também colonizaram a região do colo. Dez isolados – 16 % do total – não colonizaram nem o entorno do sistema radicular nem a região do colo.

Dos dezoito isolados que colonizaram parcialmente o sistema radicular, dezesseis colonizaram a região do colo, indicando que mesmo a colonização parcial do sistema radicular, da maneira como foi definida neste trabalho, pode ser indicadora da capacidade das bactérias em colonizarem o colo (Quadro 2).

As bactérias testadas apresentaram capacidades de colonização diferentes, ou seja, algumas colonizaram o sistema radicular, outras o colo ou, ainda, os dois. É possível que essa característica, a colonização de uma ou outra região, varie entre os isolados. Habe & Uesugi (2000) verificaram que o número de bactérias que colonizaram o rizoplane, que é a interface das raízes e do solo circundante, foi maior que o das bactérias que colonizaram a rizosfera, isto é, a região do solo sob influência das raízes.

A concentração de bactérias na região próxima ao colo da planta, mas sem nenhuma colonização ao longo das raízes, pode indicar um isolado bacteriano que, por ter maiores necessidades de  $\text{O}_2$ , desloca-se para a superfície em busca de  $\text{O}_2$ , resultando em falha na colonização geral das raízes (Uesugi, 2003).

Como não foi feita adição de fonte de C ao meio utilizado, composto apenas por ágar e água, somente se desenvolveram as bactérias que conseguem sobreviver utilizando os exsudatos radiculares da plântula de alface ou que são atraídas por quimiotaxia (Habe & Uesugi, 2000). Esse deve ser o caso das bactérias do gênero *Pseudomonas*, conhecidas como habitantes de rizosfera, o que explica a sua capacidade de usar exsudatos radiculares (Nehl & Brown, 1996; Misko & Germida, 2002). Segundo Freitas (1994), o estabelecimento do microrganismo na rizosfera garante sua interação com a planta, mesmo que essa relação seja prejudicial.

Métodos *in vitro* de monitoramento da colonização radicular podem ser eficientes para selecionar possíveis agentes de controle biológico *in vivo* ou promotores de crescimento (Habe & Uesugi, 2000; Silva et al., 2003). A vantagem da avaliação da colonização *in vitro* reside no fato de permitir a avaliação rápida de um grande número de isolados.

**Quadro 2.** Ocorrência de colonização do sistema radicular (SR) e na região do colo (CL) de alface *in vitro*

Isolado	Colonização		Isolado	Colonização		Isolado	Colonização		Isolados	Colonização	
	SR	CL		SR	CL		SR	CL		SR	CL
Ps 21A	- <sup>(1)</sup>	-	Ps 852A	+	+	Ps 859	+/-	+	Ps 867	+/-	+
Ps 31B	+	+	Ps 852B	+	+	Ps 860	-	+	Ps 868	+/-	+
Ps 41A	-	+	Ps 852C	+/-	+	Ps 861A	-	+	Ps 869A	+/-	+
Ps 42B	-	+	Ps 852D	-	+	Ps 861B	+/-	+	Ps 869C	+/-	+
Ps 43B	-	+	Ps 853A	-	+/-	Ps 862A	-	+/-	Ps 869D	-	+
Ps 44B	+/-	+/-	Ps 853B	-	+/-	Ps 862B	-	+/-	Ps 870A	-	+/-
Ps 70	-	+	Ps 854A	-	+/-	Ps 863	-	+/-	Ps 870B	+/-	+
Ps 80	-	+/-	Ps 854B	+/-	+	Ps 864A	-	+	Ps 870C	+	+
Ps 85	-	+	Ps 855B	-	+	Ps 864B	+	+	Ps 871A	+	+
Ps 91	-	+/-	Ps 855C	-	+/-	Ps 864C	+/-	+	Ps 871B	-	+
Ps 92	-	+	Ps 856A	-	+/-	Ps 865A	-	+/-	Ps 871C	-	-
Ps 221	+/-	+	Ps 856B	-	-	Ps 865B	+/-	+	Ps 872	-	-
Ps 851A	-	-	Ps 857A	-	-	Ps 865C	+/-	+	Ps 873A	+	+
Ps 851B	-	-	Ps 857B	-	-	Ps 865D	+/-	+	Ps 873C	+	+
Ps 851C	-	-	Ps 857C	-	-	Ps 866A	-	+	Ps 873D	-	+/-
Ps 851D	-	+/-	Ps 858	+/-	+/-	Ps 866B	+/-	+	Ps 874	+/-	+

<sup>(1)</sup> + = colonização em plântulas de quatro ou cinco tubos de ensaio. - = ausência de colonização em quatro ou cinco tubos de ensaio. +/- = colonização parcial em dois ou três tubos de ensaio.

### Promoção de crescimento

Dos 64 isolados de *Pseudomonas* sp. avaliados, doze – cerca de 18 % do total – promoveram o crescimento das plantas (Quadro 3). Quatro isolados – Ps 31B, Ps 80, Ps 852A e Ps 853B – aumentaram a massa de matéria seca da raiz das plântulas em que foram inoculados em relação à testemunha e nove – Ps 853B, Ps 854B, Ps 861A, Ps 861B, Ps 864C, Ps 866A, Ps 866B, Ps 872 e Ps 873C – aumentaram o número de folhas. Como se pôde ver, um dos isolados – Ps 853B – foi benéfico tanto quando se considerou o aumento da matéria seca da raiz quanto o do número de folhas. Esse isolado colonizou parcialmente a região do colo.

Esses resultados demonstram a dificuldade de associação dos resultados obtidos *in vitro* com os obtidos no campo. Demonstram também que a colonização do colo em meio de cultura pode ser suficiente para considerar a bactéria capaz de se associar à planta. De maneira semelhante, Silveira et al. (1995) observaram aumento da massa de matéria seca das raízes de plantas de feijão que receberam isolados de *Pseudomonas* sp., mas não houve diferenças quanto à matéria seca da parte aérea. Inversamente, também em alface, Gasoni et al. (2001) obtiveram respostas positivas apenas em relação à massa da matéria fresca da parte aérea. Chiarini et al. (1997), por sua vez, obtiveram aumentos significativos tanto na massa da matéria fresca da parte aérea como também da raiz quando plantas de sorgo receberam *Pseudomonas fluorescens* ou *Burkholderia cepacia*.

Na comparação dos efeitos dos isolados sobre o crescimento das plantas (Quadro 3) com os dados sobre a colonização radicular (Quadro 2), observa-se que dois dos isolados que aumentaram a matéria seca das raízes – Ps 31B e Ps 852A – colonizaram tanto o sistema radicular quanto a região do colo, enquanto os outros dois – Ps 80 e Ps 853B – colonizaram somente a região do colo e, ainda assim, parcialmente.

Dentre os nove isolados que aumentaram significativamente o número de folhas, apenas um – Ps 872 – não exibiu forma de colonização do sistema radicular ou do colo das plantas em que foi inoculado (Quadros 2 e 3). Essa ausência de colonização pode indicar que o método de avaliação aqui testado tem limitações ou, ainda, que o isolado pode ser um colonizador endofítico, situação em que sua presença não seria detectada externamente às raízes. Na literatura, há trabalhos sobre isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* que colonizam endofiticamente plântulas de abeto híbrido (*Picea glauca x engelmannii*) (Shishido et al., 1999; Chanway et al., 2000). Essas bactérias, por colonizarem internamente os tecidos da raiz, podem ser mais efetivas como RPCPs, pois não estariam tão vulneráveis às condições do solo e do ambiente (Sturz & Nowak, 2000).

Os isolados Ps 91 e Ps 856A reduziram a massa de matéria seca da parte aérea das plantas em que foram inoculados. Freitas et al. (2003) obtiveram resultado semelhante com o próprio isolado Ps 91, em que todas as plantas que o receberam morreram.

**Quadro 3. Massa da matéria seca (MS) da parte aérea, raízes e total e número de folhas de alface em presença de diferentes isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas***

Isolado	MS			Número de folhas	Isolado	MS			Número de folhas
	Parte aérea	Raiz	Total			Parte aérea	Raiz	Total	
	g					g			
Testemunha	2,00	1,51	3,52	19,4	Ps 859	2,08	1,71	3,79	21,6
Ps 21A	2,06	1,41	3,47	20,0	Ps 860	2,13	1,97	4,10	22,8
Ps 31B	1,96	2,86 <sup>(1)</sup>	4,82	20,0	Ps 861A	2,19	2,15	4,34	24,4 <sup>(1)</sup>
Ps 41A	1,99	1,91	3,90	22,0	Ps 861B	1,98	1,62	3,59	23,6 <sup>(1)</sup>
Ps 42B	1,79	1,97	3,76	18,6	Ps 862A	1,81	1,47	3,28	21,0
Ps 43B	2,16	2,3	4,46	20,2	Ps 862B	1,92	1,46	3,38	21,4
Ps 44B	1,54	2,19	3,74	19,0	Ps 863	2,37	2,16	4,53	22,8
Ps 70	1,84	1,43	3,27	20,2	Ps 864A	1,70	1,25	2,95	19,4
Ps 80	1,82	2,90 <sup>(1)</sup>	4,72	21,2	Ps 864B	1,87	1,61	3,48	22,2
Ps 85	1,83	1,06	2,89	20,4	Ps 864C	2,28	1,77	4,05	23,2 <sup>(1)</sup>
Ps 91	1,34 <sup>(1)</sup>	1,66	3,00	18,6	Ps 865A	2,11	2,39	4,50	23,0
Ps 92	2,05	2,16	4,21	21,2	Ps 865B	1,83	2,12	3,95	22,8
Ps 221	1,61	1,55	3,16	19,8	Ps 865C	2,00	2,30	4,31	22,0
Ps 851A	1,87	2,39	4,26	21,2	Ps 865D	2,26	2,64	4,90	22,4
Ps 851B	1,86	2,18	4,03	20,2	Ps 866A	2,17	2,07	4,24	23,2 <sup>(1)</sup>
Ps 851C	2,27	2,55	4,82	22,6	Ps 866B	2,32	2,18	4,50	23,2 <sup>(1)</sup>
Ps 851D	2,03	2,59	4,62	20,8	Ps 867	2,17	2,13	4,30	23,0
Ps 852A	1,51	2,92 <sup>(1)</sup>	4,43	20,6	Ps 868	2,26	2,19	4,44	21,4
Ps 852B	1,72	2,40	4,12	21,0	Ps 869A	2,32	2,48	4,80	23,0
Ps 852C	2,04	2,11	4,15	21,2	Ps 869C	1,51	1,17	2,68	19,2
Ps 852D	2,14	2,65	4,79	22,4	Ps 869D	1,98	2,40	4,38	22,4
Ps 853A	1,96	2,15	4,11	21,8	Ps 870A	2,12	2,65	4,78	23,0
Ps 853B	2,17	3,00 <sup>(1)</sup>	5,17	23,6 <sup>(1)</sup>	Ps 870B	1,83	2,27	4,10	21,2
Ps 854A	1,82	1,96	3,78	22,8	Ps 870C	1,98	1,83	3,81	22,0
Ps 854B	2,28	2,43	4,71	23,2 <sup>(1)</sup>	Ps 871A	1,68	2,64	4,32	21,8
Ps 855B	1,94	2,40	4,34	21,8	Ps 871B	2,24	1,81	4,06	23,0
Ps 855C	1,92	2,22	4,14	23,0	Ps 871C	1,80	1,60	3,40	20,6
Ps 856A	1,32 <sup>(1)</sup>	1,89	3,21	18,0	Ps 872	2,13	2,37	4,49	23,6 <sup>(1)</sup>
Ps 856B	1,77	1,90	3,68	19,6	Ps 873A	1,86	2,15	4,01	21,8
Ps 857A	1,97	2,74	4,70	20,6	Ps 873C	2,19	2,04	4,23	25,0 <sup>(1)</sup>
Ps 857B	1,95	2,11	4,06	22,2	Ps 873D	1,70	1,85	3,55	22,0
Ps 857C	1,88	1,74	3,63	21,6	Ps 874	2,2	1,93	4,12	22,8
Ps 858	1,66	2,07	3,74	20,4					

<sup>(1)</sup> Estas médias diferem da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett a 5 %.

em um experimento com areia esterilizada. Neste trabalho, ambos os isolados colonizaram parcialmente a região do colo (Quadros 2 e 3), o que vem novamente ao encontro da afirmação de que a colonização radicular é necessária para a interação com a planta, seja de forma benéfica, seja prejudicial.

Numa análise geral, também levando em conta a relação entre o estabelecimento das bactérias na região rizosférica e algum efeito sobre o crescimento vegetal, dez isolados bacterianos – Ps 21A, Ps 851A, Ps 851B, Ps 851C, Ps 856B, Ps 857A, Ps 857B, Ps 857C, Ps 871C e Ps 872 – não colonizaram a região do colo nem a da raiz. Os nove primeiros não influenciaram o crescimento das plantas, seja quanto à massa de matéria seca, seja quanto ao número de folhas; apenas o isolado Ps 872 promoveu aumento no número de folhas, conforme discutido acima.

Outros trinta e nove isolados – 61 % do total –, embora tenham apresentado algum tipo de colonização, não exerceram influência sobre o crescimento vegetal. Assim, a avaliação da colonização radicular pela observação da névoa na região do colo é suficiente para indicar a ocorrência dessa interação, ainda que não seja um método absolutamente seguro, pela possibilidade da ocorrência de bactérias endofíticas.

#### Teste de antagonismo *in vitro*

Pelos procedimentos realizados, obtiveram-se isolados de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (dados não apresentados). Desses, apenas o último foi utilizado nos testes de antagonismo, por ser o único potencialmente patogênico às plantas de alface.



A colônia fúngica nas proximidades das colônias bacterianas apresentou duas formas de crescimento: numa delas havia competição entre as colônias dos microrganismos, com o fungo evitando crescer sobre a colônia bacteriana; na outra forma, não houve qualquer inibição do crescimento, tendo ocorrido crescimento fúngico sobre a colônia bacteriana. Não foram observados halos de inibição. Freitas & Pizzinatto (1991; 1997) utilizaram os mesmos dois meios de cultura usados neste trabalho, porque, por ser pobre em Fe, o meio B de King estimula a produção de sideróforo, o que não ocorre em BDA; essas características permitiram distinguir a forma pela qual os isolados exerciam seu antagonismo contra os patógenos testados. Todavia, essa comparação não pôde ser feita neste trabalho, já que não se observou a ocorrência de halos de inibição. Quando houve interação, as bactérias apenas impediram o crescimento do fungo por cima das colônias bacterianas, indicando uma possível competição por nutrientes. No antagonismo, um dos microrganismos diminui o crescimento do outro, geralmente pela produção de substâncias tóxicas, enquanto, na competição, há luta por um ou mais fatores limitantes.

Apenas 12 de 64 isolados (Quadro 4) de *Pseudomonas* testados - cerca de 18 % do total - apresentaram algum efeito sobre o crescimento *in*

*vitro* do fungo *Fusarium* sp. Desses doze, somente os isolados Ps 864C, Ps 866A e Ps 866B promoveram o crescimento das plantas de alface (Quadro 3). O isolado Ps 866B interagiu com o fungo tanto em meio BDA quanto em meio B de King (Quadro 4). Os outros isolados - Ps 864C e Ps 866A - competiram com o fungo apenas em BDA. Os três isolados ocorreram na região do colo, tendo os isolados Ps 864C e Ps 866B apresentado colonização parcial das raízes (Quadro 3). Há muitos trabalhos que relatam ausência de correlação entre antagonismo *in vivo* e *in vitro* (Freitas & Pizzinatto, 1991; 1997). Diferentemente, Lucon & Melo (1999) observaram que 94 isolados apresentaram atividade antagônica contra *Erwinia carotovora*, tendo 41 - cerca de 43 % do total - sido capazes de reduzir a severidade da doença em tubérculos de batata nos testes *in vivo*.

Os isolados Ps 851D, Ps 852B, Ps 852C, Ps 857C, Ps 864A, Ps 865A e Ps 871B, mesmo competindo com o fungo e colonizando a região do colo, não foram eficientes como promotores de crescimento (Quadros 2, 3 e 4).

Bagnasco et al. (1998) obtiveram antagonismo *in vitro* contra *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Dos 541 isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes testados, apenas 20 - 3 % do total - apresentaram atividade antagônica *in vitro*, dos quais três reduziram a incidência das doenças causadas pelos

**Quadro 4. Presença (+) ou ausência (-) de competição *in vitro* entre bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* e o fungo *Fusarium* sp. em meio BDA e em meio B de King et al. (1954)**

Isolado	BDA	B de King	Isolado	BDA	B de King	Isolado	BDA	B de King
Ps 21A	-	-	Ps 854A	-	-	Ps 865C	-	-
Ps 31B	-	-	Ps 854B	-	-	Ps 865D	-	-
Ps 41A	-	-	Ps 855B	-	-	Ps 866A	+	-
Ps 42B	-	-	Ps 855C	-	-	Ps 866B	+	+
Ps 43B	-	-	Ps 856A	-	-	Ps 867	-	-
Ps 44B	-	+	Ps 856B	-	-	Ps 868	-	-
Ps 70	-	-	Ps 857A	-	-	Ps 869A	-	-
Ps 80	-	-	Ps 857B	-	-	Ps 869C	-	-
Ps 85	+	+	Ps 857C	+	-	Ps 869D	-	-
Ps 91	-	-	Ps 858	-	-	Ps 870A	-	-
Ps 92	-	-	Ps 859	-	-	Ps 870B	-	-
Ps 221	-	-	Ps 860	-	-	Ps 870C	-	-
Ps 851A	-	-	Ps 861A	-	-	Ps 871A	-	-
Ps 851B	-	-	Ps 861B	-	-	Ps 871B	-	+
Ps 851C	-	-	Ps 862A	-	-	Ps 871D	-	-
Ps 851D	+	-	Ps 862B	-	-	Ps 872	-	-
Ps 852A	-	-	Ps 863	-	-	Ps 873A	-	-
Ps 852B	+	-	Ps 864A	+	-	Ps 873C	-	-
Ps 852C	+	-	Ps 864B	-	-	Ps 873D	-	-
Ps 852D	-	-	Ps 864C	+	-	Ps 874	-	-
Ps 853A	-	-	Ps 865A	-	+			
Ps 853B	-	-	Ps 865B	-	-			

+ = competição, com o fungo evitando crescer sobre a colônia bacteriana. - = ausência de competição, com crescimento fúngico sobre a colônia bacteriana.

patógenos em testes *in vivo*. O percentual de isolados antagônicos varia bastante na literatura: Freitas & Pizzinatto (1997) relataram que 83 % dos isolados de *Pseudomonas* sp. do grupo fluorescente apresentaram antagonismo a *Colletotrichum gossypii*.

Neste trabalho, a interação manifestou-se, mais provavelmente, como competição por nutrientes e não como antagonismo. Por isso, não foi possível relacionar a interação *in vitro* com a capacidade de promoção do crescimento pelas bactérias.

### CONCLUSÕES

1. A visualização de névoa na região do colo da planta indicou a presença da bactéria na rizosfera.
2. A presença de bactérias na região do colo não significou necessariamente efeito da bactéria sobre o crescimento vegetal.
3. Alguns isolados de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* apresentaram competição *in vitro* contra *Fusarium* sp., de modo não determinado.
4. Não houve relação entre a promoção do crescimento e a competição *in vitro*.

### AGRADECIMENTOS

À FUNDAG, pelo apoio financeiro; à Dra. Maria Angélica Pizzinatto, pelo auxílio na identificação dos fungos, e a Rosana Gierts Gonçalves, Maria Tereza Bueno Mangussi e Maria Leonilde Machado de Souza, pelo apoio no laboratório e na casa de vegetação.

### LITERATURA CITADA

- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R. & LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant Soil, 204:57-67, 1998.
- BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F. & ARIAS, A. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biol. Biochem., 30:1317-1322, 1998.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H. & CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Plant Soil, 184:311-321, 1996.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. For. Ecol. Manag., 133:81-88, 2000.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. Soil Biol. Biochem., 30:81-87, 1997.
- FREITAS, S.S. Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1994. 112p. (Tese de Doutorado)
- FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T. & DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. R. Bras. Ci. Solo, 27:61-70, 2003.
- FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). Summa Phytopathol., 17:105-112, 1991.
- FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). Summa Phytopathol., 23:36-41, 1997.
- GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S. & KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). Zeitschrift Fur Pflanzenkheiten Und Pflanzenschutz – J. Plant Diseases Protec., 108:530-535, 2001.
- HABE, M.H. & UESUGI, C.H. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. Fitopatol. Bras., 25:657-660, 2000.
- HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M.K. & SIKORA, R.A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. Zeitschrift Fur Pflanzenkheiten Und Pflanzenschutz – J. Plant Diseases. Protec., 105:349-358, 1998.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307, 1954.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TIENTZE, M. & SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, 286:885-886, 1980.
- LUCON, C.M.M. & MELO, I.S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. Summa Phytopathol., 25:132-136, 1999.
- MISKO, A.L. & GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. FEMS Microbiol. Ecol., 42:399-407, 2002.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens* Soil Biology Biochem., 33:603-612., 2001.
- NEHL, D.B. & BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. Appl. Soil Ecol., 5:1-20, 1996.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protec., 20:1-20, 2001.

- SARATHCHANDRA, U.; DUGANZICH, D. & BURCH, G. Occurrence of antifungal fluorescent *Pseudomonas* spp on some horticultural and pastoral plants. N.Z.J. Crop Hortic. Sci., 21:267-272, 1993.
- SHISHIDO, M.; BREUIL, C. & CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol. Ecol., 29:191-196, 1999.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S. & MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. J. Phytopathol., 151:42-46, 2003.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O. & CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. R. Bras. Ci. Solo, 19:205-211, 1995.
- SUSLOW, T.V. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S. & LARY, G.H., eds. Phytopathogenic Prokaryotes. London, Academic Press, 1982. v.2, p.187-223.
- STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J. & DOUDOROFF, M. The aerobic Pseudomonads: A taxonomic study. J. Gen. Microbiol., 43:159-271, 1966.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol., 15:183-190, 2000.
- TUITE, J. Plant pathological methods fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1969. 239p.
- UESUGI, C.H. Informação sobre colonização radiculares. Mensagem recebida por <drinano@yahoo.com.br> em 31 mar. 2003
- WELLER, D.M. & ZABLOTOWICZ, R. Recent results from field and greenhouse trials on biological control of diseases with obvious, visual and typical symptoms. In: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1., Orillia, 1987. Proceedings. Orillia, 1987. p.10-16.