

TALYTA GALAFASSI ZARPELON

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS E EFICIÊNCIA DO
RIZOLYPTUS[®] NO ENRAIZAMENTO E CRESCIMENTO DE
EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

TALYTA GALAFASSI ZARPELON

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS E EFICIÊNCIA DO
RIZOLYPTUS[®] NO ENRAIZAMENTO E CRESCIMENTO DE
EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de março de 2007

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Pesq. Poliane Alfenas-Zerbini
(Co-Orientadora)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Pesq. Douglas Lau

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las”
(Aristóteles)

“Tudo passa”

As minhas avós Eudócia (*in memorian*) e Sustena (*in memorian*),
Por acreditarem sempre e representarem a expressão do amor à família.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom de vida e por ser presença constante de luz em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação em Engenharia Florestal e de pós-graduação em Fitopatologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa durante o período de pós-graduação.

À Bio Soja Industria Química e Biológica pelo fornecimento do inoculante.

À CAF Florestal Santa Bárbara e Veracel pelo apoio logístico e financiamento de parte deste trabalho.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pela vibração, orientação e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Ao Dr. Eli pela amizade, pelo acompanhamento e pela colaboração na elaboração dos trabalhos.

Ao Prof. Maffia pela valiosa cooperação, atenção e pelos ensinamentos.

À Dr. Poliane pela confiança no trabalho, pelas sugestões e pela disponibilidade em ensinar.

Ao Prof. Olinto e ao Dr. Douglas pela amizade e sugestões que enriqueceram o trabalho.

Ao Dr. Lúcio Guimarães pela paciência em ensinar e reensinar com motivação. Seu estímulo foi decisivo para a conclusão deste trabalho.

À Márcia Maria Brandão pela amizade, paciência e dedicação constante.

Aos amigos Fernanda, Michelle, Marcelo, Léo Batata, Tissiany, Sílvia e Loly que mesmo distantes estão sempre do meu lado.

À amiga Daniela pelo apoio e pelos momentos de alegria vividos na graduação e pós-graduação.

Ao Marcelo, pelo amor, pela paciência e ajuda nas montagens e avaliações dos experimentos.

Aos meus pais José Maria e Claudete, pelo amor e pela dedicação.

Ao meu irmão Tiago, pela coragem e força em alcançar seus objetivos e que é fonte de inspiração para mim.

Aos funcionários Alex, Cíntia, Euzébio, Ricardo e Rafael e especialmente ao Renildo pela enorme colaboração e participação durante todo o período de pesquisa.

A todos que acreditaram neste trabalho e que contribuíram para sua realização.

BIOGRAFIA

Talyta Galafassi Zarpelon, filha de José Maria Zarpelon e Maria Claudete Galafassi Zarpelon, nasceu a 18 de maio de 1978, em Cornélio Procópio, Estado do Paraná.

Ingressou em 1999, no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no qual foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Instituição, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas, defendendo tese em março de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO _____	ix
ABSTRACT _____	xi
INTRODUÇÃO GERAL _____	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	4
<i>ARTIGO 1</i> _____	6
Caracterização de isolados de rizobactérias promotoras de enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto _____	6
RESUMO _____	6
ABSTRACT _____	8
1. INTRODUÇÃO _____	10
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	13
2.1. Isolados de rizobactérias _____	13
2.2. Caracterização morfológica dos isolados de rizobactérias _____	13
2.3. Sensibilidade dos isolados de rizobactérias a antibióticos _____	14
2.4. Caracterização molecular dos isolados de rizobactérias _____	15
2.4.1. Extração do DNA _____	15
2.4.2. Reação de PCR _____	16
2.4.3. Análise de restrição dos fragmentos _____	16
3. RESULTADOS _____	18
3.1. Caracterização morfológica dos isolados de rizobactérias _____	18
3.2. Sensibilidade dos isolados de rizobactérias a antibióticos _____	24
3.3. Caracterização molecular _____	26
4. DISCUSSÃO _____	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	33

ARTIGO 2	37
Eficiência de duas formulações de rizobactérias no enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto	37
RESUMO	37
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Formulações	43
2.2. Viabilidade dos isolados de rizobactérias nas formulações líquida e turfosa	43
2.3. Eficiência do produto <i>Rizolyptus</i> [®] sobre o enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto	44
2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas	45
3. RESULTADOS	47
3.1. Viabilidade dos isolados de rizobactérias nas formulações líquida e turfosa	47
3.2. Eficiência das formulações turfosa e líquida sobre o enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto	49
4. DISCUSSÃO	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CONCLUSÕES GERAIS	69

RESUMO

ZARPELON, Talyta Galafassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do *Rizolyptus*[®] no enraizamento e crescimento de eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Luiz Antônio Maffia e Poliane Alfenas-Zerbini.

A partir de uma série de experimentos iniciados no final da década de 90, comprovaram-se os efeitos benéficos de isolados de rizobactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos, quando inoculados na forma de suspensão salina ao substrato. Para que sua utilização se tornasse operacionalmente viável, formularam-se os isolados mais promissores em turfa canadense e em solução estabilizante, e realizou-se sua caracterização morfológica, molecular e a sensibilidade a antibióticos. Após 24 horas de incubação, as características de elevação e coloração das colônias permitiram a diferenciação dos isolados de todas as espécies estudadas. Ademais os isolados S1, S2 e 3918 de *Bacillus subtilis*, MF2 e MF4 de *Pseudomonas* sp. e Ca de *Pseudomonas fulva* foram diferenciados por suas características morfológicas e pela sensibilidade a antibióticos. A análise de PCR-RFLP permitiu a diferenciação entre os isolados CIIB de *Stenotrophomonas maltophilia*, R1 de *Frateuria aurantia* e FL2 de *Pseudomonas aeruginosa* e entre os grupos dos isolados S1, S2 e 3918 de *Bacillus* e MF2, MF4 e Ca de *Pseudomonas*. A eficiência dos inoculantes na produção de mudas de eucalipto variou de acordo com o clone, tipo de formulação e isolado testado. Em geral, o clone de *E. grandis* (11) respondeu melhor à rizobacterização (Alfenas *et al.*, 2004) que o de *E.*

grandis x *E. urophylla* (409). A formulação turfosa propiciou maiores incrementos para as variáveis velocidade de enraizamento, biomassa da parte aérea e do sistema radicular. Os isolados R1, FL2, S1 e S2 destacaram-se por apresentarem maior incremento de enraizamento e o isolado S2 para o incremento da biomassa da parte aérea e do sistema radicular. Tanto a formulação turfosa quanto a líquida mostraram-se eficientes na indução de enraizamento de miniestacas e no crescimento de mudas, sendo seu uso uma alternativa prática e viável a ser adotada na produção de mudas de eucalipto.

ABSTRACT

ZARPELON, Talyta Galafassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Rhizobacteria characterization and *Rizolyptus*[®] efficiency in eucalyptus rooting and growth.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Advisers: Luiz Antônio Maffia and Poliane Alfenas-Zerbini.

Since the late 90s, experiments have shown the beneficial effects of rhizobacteria isolates obtained from the rhizosphere of seedlings of different clones of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* and their hybrids, when inoculated to the substratum with a saline suspension. To make its use operationally viable, the most promising isolates were formulated in canadian turf and in stabilizing solution, as well as morphological and molecular characterizations and tests of sensibility to antibiotics. After 24-h incubation, the colonial characteristics elevation and color of allowed the differentiation of isolates of all studied species. Besides the isolates S1, S2 and 3918 of *Bacillus subtilis*, MF2 and MF4 of *Pseudomonas* sp. and Ca of *Pseudomonas fulva* were differentiated by their morphological characteristics and the sensibility to antibiotics. PCR-RFLP analysis allowed the differentiation among isolates CIIB of *Stenotrophomonas maltophilia*, R1 of *Frateuria aurantia* and FL2 of *Pseudomonas aeruginosa* and between the groups of *Bacillus* isolates S1, S2 and 3918 and *Pseudomonas* MF2, MF4 and Ca. The efficiency of inoculants in the production of eucalyptus seedlings varied with clones, types of tested formulation and isolate. In general, clones of *E. grandis* (11) gave better response to rhizobacterization (Alfenas *et al.*, 2004) than *E. grandis* x *E. urophylla* (409). The turf formulation provided larger increases for the variables rooting speed,

biomass of aerial part and root system. Isolates R1, FL2, S1 and S2 stood out for showing larger rooting increase and isolated S2 for increasing the biomass of the aerial part and root system. Both the turf and the liquid formulations were shown to be efficient in inducing minicutting rooting and seedling growth, being a practical and viable alternative to be adopted in eucalyptus seedling production.

INTRODUÇÃO GERAL

A clonagem por estaquia, introduzida no Brasil no final da década de 70, representa um dos maiores avanços da eucaliptocultura brasileira. Desde sua implantação em escala comercial, a propagação clonal de *Eucalyptus* vem sofrendo grandes progressos tecnológicos, especialmente quanto aos métodos de produção e colheita de brotos para estaquia, tipo de substrato, recipiente e modelos de casa de enraizamento e aclimatação (Alfenas *et al.*, 2004). Entretanto, a estaquia convencional ou macroestaquia apresenta inúmeros obstáculos, como o baixo percentual de enraizamento de algumas espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos e a perda gradual do potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogenético das matrizes (Assis, 1997). Com o advento das técnicas de miniestaquia e microestaquia, na década de 90, a maioria desses problemas foram amenizados, o que tornou possível a multiplicação comercial de clones de difícil enraizamento. No entanto, apesar das inúmeras vantagens da miniestaquia (Alfenas *et al.*, 2004) alguns clones possuem baixo índice de enraizamento ou sistema radicular malformado, o que constitui uma limitação para o seu estabelecimento no campo. Com o objetivo de minimizar estes problemas, o emprego de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas desponta como uma alternativa viável a ser empregada nos viveiros clonais. A partir de uma série de experimentos têm sido comprovados os efeitos benéficos das rizobactérias em promover o enraizamento de estacas, o crescimento de mudas (Mafia, 2004; Mafia *et al.*, 2005; Teixeira, 2001; Teixeira *et al.*, 2007) e o controle biológico de doenças que afetam a propagação clonal do eucalipto (Ladeira, 2004; Teixeira, 2001; Teixeira *et al.*, 2005).

Dentre 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de *Eucalyptus*, nove se destacaram quanto ao potencial de enraizamento de miniestacas de eucalipto e foram identificados sendo três de *Bacillus subtilis* Cobn, 1872 (S1, S2 e 3918), um de *Pseudomonas fulva* Lizuga & Komagata, 1963 (Ca), um de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900 (FL2), um de *Frateuria aurantia* Swings et al., 1980 (R1), um de *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh, 1872) Palleroni & Bradbury, 1993 (CIIB) e dois de *Pseudomonas* sp. Migula, 1894 (MF2 e MF4) baseando-se nas seqüências parciais da região 16S do DNA ribossomal (Teixeira *et al.*, 2007).

Posteriormente testou-se a mistura de isolados compatíveis “in vitro”, em ensaio realizado em casa de vegetação destacando-se as misturas dos isolados VC2 (não identificado) + Ca (*P. fulva*) para enraizamento e VC2 + 3918 (*B. subtilis*) para biomassa radicular (Mafia, 2004). Nestes estudos observaram que as respostas obtidas variavam de acordo com o clone e o isolado empregado. Em um estudo para investigar a especificidade da interação de isolados de rizobactérias e oito clones de eucalipto, não foi observado efeito deletério das rizobactérias na rizogênese do eucalipto, mas os incrementos em enraizamento e biomassa radicular variaram conforme o isolado e o clone testado, evidenciando a especificidade na interação (Mafia, 2004). A forma de veiculação das rizobactérias também foi testada e os resultados variaram de acordo com o clone, forma de aplicação e o isolado empregado. A veiculação direta no substrato é a mais operacional, devido à facilidade de aplicação. A imersão de miniestacas na suspensão de inóculo, ou ainda, as duas formas de veiculação concomitantemente torna-se uma alternativa de inoculação, principalmente quando o objetivo é o biocontrole de patógenos apodrecedores de miniestacas de eucalipto (Mafia, 2004).

No primeiro estudo de avaliação da eficiência das rizobactérias no controle de doenças, os isolados FL2 (*P. aeruginosa*) e MF4 (*Pseudomonas* sp.) destacaram-se por reduzir a severidade de ferrugem (*Puccinia psidii*) em mudas inoculadas com rizobactérias pré-selecionadas, evidenciando a indução de resistência sistêmica (Teixeira *et al.*, 2005). A incidência de patógenos como *Cylindrocladium candelabrum* Viégas, *Rhizoctonia solani* Kühn (Mafia, 2004) e *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart)

Simpson (sin. *Sporothrix eucalypti* Wingfield, Crous & Swart) (Ladeira, 2004), foi também menor em mudas de eucalipto, multiplicados em substrato rizobacterizado.

Nesses experimentos de rizobactérias com eucalipto (Ladeira, 2004; Mafia, 2004; Mafia *et al.*, 2005; Teixeira, 2001; Teixeira *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007) e outras culturas (Boer *et al.*, 1999; Enebak *et al.*, 1997; Klopper *et al.*, 1980; Kokalis-Burelle *et al.*, 2002; Shishido & Chanway, 2000) utilizaram-se suspensões bacterianas, produzidas em meio de cultura. Entretanto, este tipo de inóculo é de difícil produção em grande escala e apresenta dificuldades na manipulação, no transporte, armazenamento e baixa sobrevivência ao longo do tempo.

Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma formulação para veicular os isolados e facilitar sua aplicação. Através de uma parceria entre a UFV e a Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas, desenvolveram-se duas formulações, sólida e líquida, para veicular os isolados de rizobactérias benéficas na produção de mudas de eucalipto, cujo produto passou a denominar-se *Rizolyptus*[®]. A fim de viabilizar o emprego desse inoculante em ampla escala, no presente trabalho efetuou-se a caracterização morfológica, molecular e a sensibilidade a antibióticos dos isolados de rizobactérias (Artigo 1) e avaliaram-se o período de sobrevivência das bactérias (“shelf life”) nas respectivas formulações, sua capacidade de estimular a rizogênese de miniestacas e o crescimento de mudas de eucalipto (Artigo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F.D. *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa. Imprensa Universitária. 2004.
- ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. Anais, I Conferência sobre silvicultura e melhoramento de eucaliptos, Salvador BA. 1997. pp. 300-304.
- BOER, M., VAN DER SLUIS, I., VAN LOON, L.C.; BAKKER, A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology** 105:201-210. 1999.
- ENEBAK, S.A., WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science** 44:139-144. 1997.
- KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology** 70:1078-1082. 1980.
- KOKALIS-BURELLE, N., VAVRINA, C.S., ROSSKOPF, E.N.; SHELBY, R.A. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplants and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. **Plant and Soil** 238:257-266. 2002.
- LADEIRA, M.C.G. Controle biológico de *Quambalaria eucalypti* mediado por rizobactérias. Dissertação de mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2004.

- MAFIA, R.G. Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., FERREIRA, E.M., ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore** 29:843-851. 2005.
- SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. **Canadian Journal of Forest Research** 30:845-854. 2002.
- TEIXEIRA, D.A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-*Cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- TEIXEIRA, D.A., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., FERREIRA, E.M., SIQUEIRA, L., MAFFIA, L.A.; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology** 38:1-6. 2007.
- TEIXEIRA, D.A., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira** 30:350-356. 2005.

Caracterização de isolados de rizobactérias promotoras de enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto

Talyta G. Zarpelon¹; Reginaldo G. Mafia²; Lúcio Mauro da S. Guimarães¹; Poliane Alfenas-Zerbini¹; Luis A. Maffia¹; Eli S. Lopes³; Acelino C. Alfenas¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil; ²Aracruz Celulose; ³Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas.

RESUMO

Isolados de rizobactérias obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de *Eucalyptus*, que demonstraram capacidade em aumentar a rizogênese de miniestacas, a biomassa radicular de mudas e promover o controle biológico de doenças de eucalipto, foram formulados em dois veículos (turfa canadense e solução líquida) para que sua utilização se tornasse operacionalmente viável. A fim de garantir um produto livre de contaminantes e a autenticidade dos isolados é necessária à implementação de um programa de controle de qualidade para os inoculantes produzidos. Para isso, é indispensável conhecer as características intrínsecas de cada estirpe a ser propagada. Neste trabalho, efetuou-se a caracterização morfológica e molecular de nove isolados de rizobactérias previamente selecionados, sendo três de *Bacillus subtilis*, dois de *Pseudomonas* sp., um de *P. fulva*, um isolado de *Stenotrophomonas maltophilia*, um de *Frateuria aurantia* e um isolado de *Pseudomonas aeruginosa*. Para a análise morfológica, os isolados foram repicados para três diferentes meios de cultura e avaliados quanto às características de elevação, forma das bordas, estrutura e

forma da colônia, crescimento, consistência, superfície, brilho, coloração e alteração da cor do meio. Avaliou-se também a resistência dos isolados de rizobactérias a antibióticos. Os isolados de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* sp. foram facilmente diferenciados por suas características morfológicas e pela sensibilidade a antibióticos. A análise molecular por PCR-RFLP, do rDNA 16S permitiu a separação entre os isolados CIIB, R1 e FL2 e os grupos de *Bacillus* (S1, S2 e 3918) e de *Pseudomonas* (MF2, MF4 e Ca). Os perfis de restrição produzidos por nove enzimas de restrição não diferenciaram os três isolados de *B. subtilis*, assim como não distinguiram os isolados de *Pseudomonas* sp. e *P. fulva*.

Palavras-chave: Rizobactérias, *Eucalyptus*, formulação, caracterização.

ABSTRACT

ZARPELON, Talyta Galafassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Characterization of eucalyptus minicutting root-inducing and seedling growth-promoting rhizobacteria isolates.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Adviser: Luiz Antônio Maffia and Poliane Alfenas-Zerbini.

Isolates obtained from the seedling rhizosphere of different clones of *Eucalyptus*, which have demonstrated capacity to increase minicutting rooting and seedling root biomass and to promote biological control of eucalyptus diseases, were formulated in two vehicles (canadian turf and liquid solution) to make its use operationally viable. The implementation of a quality control program for inoculant production is necessary to guarantee a pollutant-free product and isolate authenticity. Knowledge on the intrinsic characteristics of each strain to be propagated is therefore fundamental. In this work, morphological and molecular characterizations of nine previously selected rhizobacteria isolates were carried out, being three isolates of *Bacillus subtilis*, two of *Pseudomonas* sp., one of *P. fulva*, one of *Stenotrophomonas maltophilia*, one of *Frateriia aurantia* and one of *Pseudomonas aeruginosa*. For the morphological analysis, the isolates were subcultured into three different culture media and evaluated for the characteristics elevation, margin type, colony structure and shape, growth, consistence, surface, brightness, color and change in medium color. Isolate resistance to antibiotics was also evaluated. The isolates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* sp. were easily differentiated by their morphological characteristics and sensibility to antibiotics. PCR-RFLP analysis of rDNA 16S allowed the separation among the isolates CIIb, R1 and FL2 and between the groups *Bacillus* (S1, S2 and 3918) and *Pseudomonas* (MF2, MF4 and Ca). Restriction profiles produced by nine restriction enzymes

did not differentiate the three isolates of *B. subtilis* nor the isolates of *Pseudomonas* sp. and *P. fulva*.

Key words: Rhizobacteria, *Eucalyptus*, formulations, characterizations.

1. INTRODUÇÃO

A rizosfera é uma estreita zona de solo que circunda a raiz e está sob a influência do sistema radicular (5). Nesta região, predominam bactérias de vida livre ou associadas aos tecidos das plantas (2) e que podem exercer um efeito benéfico, neutro ou deletério sobre elas (5). O grupo de bactérias com características benéficas foi denominado “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – PGPR”, ou ainda, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (3, 14, 15).

Isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, foram testados e destacaram-se quanto ao potencial em promover enraizamento de estacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus* (28). Em diversos viveiros florestais, localizados em todo o país, os isolados mais promissores foram testados em escala semi-operacional, inoculados em diferentes composições de substrato, obtendo incremento em biomassa radicular e da parte aérea, maior velocidade de enraizamento e controle de doenças como *Cylindrocladium candelabrum* Viégas e *Rhizoctonia solani* Kuhn (17), *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson (sin. *Sporothrix eucalypti* Wingfield, Crous & Swart) (16), e *Puccinia psidii* Winter via indução de resistência sistêmica (28).

Atualmente, os isolados estão sendo formulados em dois veículos: turfa canadense e em solução estabilizante, para atender a demanda pelos isolados de rizobactérias em eucalipto. Na produção de qualquer microrganismo em larga escala, é fundamental o conhecimento das características intrínsecas de cada estirpe a ser propagada, de modo a permitir realizar de forma otimizada o controle de qualidade.

A detecção e identificação de bactérias pode ser realizada por métodos microbiológicos convencionais, como o isolamento, o cultivo de culturas puras em meio seletivos, testes bioquímicos e observação direta feita através de microscópio (20). Entretanto, estes métodos são trabalhosos, demandam tempo e, além disso, a ocorrência de formas intermediárias que dificultam a interpretação dos resultados, impossibilitam muitas vezes a identificação correta dessas bactérias. Métodos de detecção molecular incluindo sondas genéticas, hibridização de DNA, PCR e genes repórteres são utilizados em adição aos métodos convencionais de identificação de bactérias (7).

Os padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram os primeiros marcadores de DNA usados para se comparar diferentes isolados (29) e têm sido empregados nos estudos de genética de populações (9, 27). A análise por RFLP após a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) das seqüências parciais da região 16S do DNA ribossomal é uma técnica apropriada e rápida para diferenciar e caracterizar microrganismos com base nas relações filogenéticas (1). Os genes ribossomais (rDNA) são encontrados em todos os microrganismos e são conhecidos por sua baixa taxa de mutação. Os intervalos entre as regiões altamente conservadas dos genes ribossomais, são regiões que apresentam seqüências variáveis chamadas de regiões espaçadoras. As mutações dentro das regiões espaçadoras ocorrem com maior freqüência que com os genes ribossomais, sendo estas mutações de grande utilidade para a separação entre gêneros e espécies (6, 12, 27). Em DNA bacteriano, o rDNA inclui os locos 16S, 23S e 5S, os quais são separados pela região denominada ITS, espaço interno transcrito. Dessa forma, pode-se utilizar o rDNA para estudo de grupos heterogêneos ou a região espaçadora (ITS) entre genes conservados para o estudo de grupos muito similares. Assim, a análise PCR-RFLP da região 16S do DNA ribossomal é um método utilizado para diferenciação de espécies (24-26) e a maioria das caracterizações é realizada utilizando um pequeno número de enzimas e uma interpretação visual do padrão de restrição. Além disso, este método é mais rápido do que o seqüenciamento da região 16S do rDNA e menos oneroso.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos efetuar a caracterização morfológica, molecular e a sensibilidade a antibióticos dos isolados de rizobactérias previamente selecionados, visando à utilização destes métodos na

detecção de contaminantes e autenticação dos isolados, auxiliando no controle de qualidade do produto *Rizolyptus*[®] a ser comercializado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados de rizobactérias

Foram utilizados nove isolados de rizobactérias que se destacaram quanto ao potencial em promover enraizamento de estacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus*. Os isolados denominados de S1, S2 e 3918 pertencem a espécie *Bacillus subtilis* Cohn, 1872, o isolado Ca foi determinado como da espécie *Pseudomonas fulva* Lizuga & Komagata, 1963, o isolado FL2 de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900, o isolado CIIB é da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh, 1872) Palleroni & Bradbury, 1993, o isolado R1 de *Frateruia aurantia* Swings *et al.*, 1980 e os isolados MF2 e MF4 foram identificados como *Pseudomonas* sp. Migula, 1894 (28).

2.2. Caracterização morfológica dos isolados de rizobactérias

Os isolados de rizobactérias foram caracterizados morfológicamente em três diferentes meios de cultura. Para isso, eles foram inicialmente repicados para o meio 523 e em seguida transferidos para placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo os meios: 523 (13), YMA (yeast extract-manitol-ágar) e Ágar Nutritivo-Glicose (18), em estado sólido.

Após a repicagem dos isolados, as placas de Petri foram mantidas a 28°C por 24 e 48 h, no escuro. As avaliações foram realizadas com o auxílio de biocular estereoscópica Leica Zoom 2000 e utilizou-se um padrão de classificação (Figura 1) para bactérias segundo os critérios de elevação, estrutura da superfície, forma da colônia e das bordas. Além destas características, os isolados foram avaliados

quanto aos critérios de crescimento (muito rápido: menos de 1 dia, rápido: entre 1 e 2 dias, médio: entre 2 e 3 dias, lento: 3 e 4 dias e muito lento: mais de 4 dias), consistência (mucosa, fluida e micelial), superfície (lisa e rugosa), brilho (brilhante, translúcida e opaca), coloração e alteração da cor do meio.

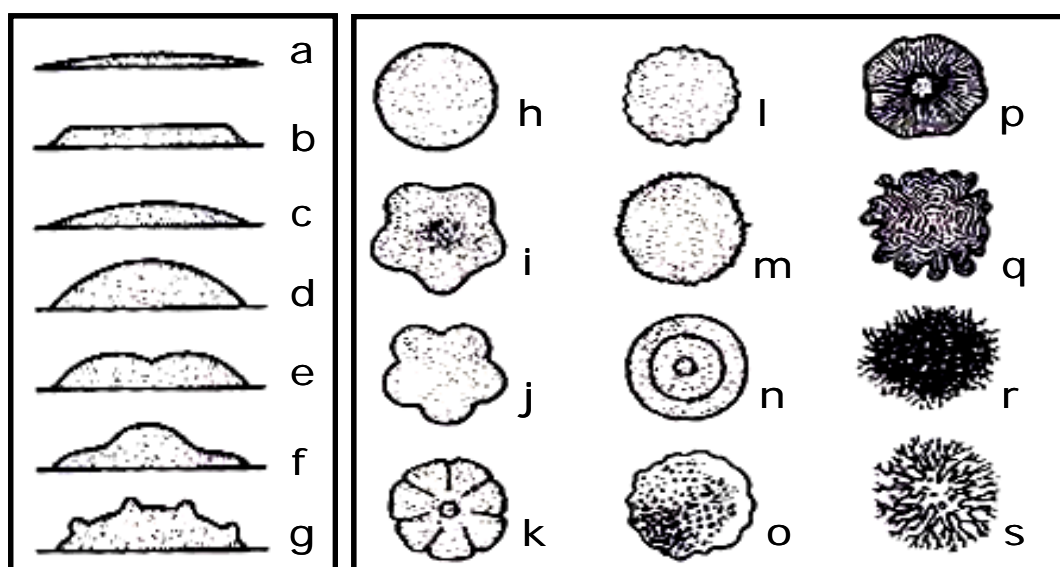


Figura 1. Padrão utilizado na caracterização morfológica dos isolados pré-selecionados de rizobactérias. Quanto à elevação das colônias, temos: **a** – chata; **b** – espalhada; **c** – convexa baixa; **d** – convexa alta; **e** – umbilicada; **f** – centro-saliente e **g** – papilífera. Em relação à forma: **h, k, l, m, n e p** – circular; **i, j, o, q** – irregular e **r, s** – rizóide. A estrutura das colônias: **h, l, m, n** – amorfa; **i, j, k, o** – granulosa; **q** – cacheada e **p, r, s** – filamentosas. As bordas das colônias foram classificadas como: **h, n** – inteiros; **i, o, p, q** – ondulados; **j, k** – lobados; **l, m** – denticulados e **r, s** – franjados.

2.3. Sensibilidade dos isolados de rizobactérias a antibióticos

Para avaliar a resistência dos isolados de rizobactérias a antibióticos seguiu-se o método padrão do antibiograma (21). Para isso, os isolados de rizobactérias foram repicados para o meio 523 em estado sólido e incubados a

28°C no escuro. Após 48 h de incubação, obteve-se uma suspensão bacteriana em solução salina de NaCl a 0,85%. Após esta etapa, foram distribuídos 0,1 mL da suspensão ($O.D._{540} = 0,2$) em placas de Petri, onde posteriormente foram depositados 4 discos de 28 antibióticos posicionados eqüidistantemente entre si (Tabela 3).

O experimento foi composto por três réplicas e a avaliação realizada 48 h após a montagem do ensaio, onde foi determinada a presença do halo de inibição.

2.4. Caracterização molecular dos isolados de rizobactérias

2.4.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 e incubados por 48 h a 27°C no escuro. Após este período, colônias de cada isolado foram repicadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio 523 líquido (13). Os tubos de ensaio foram mantidos por 18 h a 37°C, em agitação constante de 225 rpm. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Graves e Swaminathan (11), com algumas modificações descritas a seguir. Após o crescimento, as suspensões bacterianas (5 mL) foram centrifugadas (5000 rpm/5 min) e o precipitado formado ressuspensionado em 675 µL de solução tampão (Tris 0,1 M, NaCl 5 M, pH 8,0). Em seguida, homogeneizou-se em “vortex” e adicionaram-se 9 µL de lisozima (2 mg/mL). Após incubação por 1 hora a 37°C, foram adicionados 45 µL de SDS (sódio-dodecyl-sulfato) a 20% e novamente incubadas por 30 min a 37°C. Aos tubos foram adicionados 4,5 µL de proteinase K (20 µg/µL), 165 µL de NaCl 5M e 132 µL de CTAB/NaCl (CTAB 10%/NaCl 4,1%) e homogeneizou-se por 10 min. Após incubação por 10 min a 65°C, seguido de 5 min a 37°C, as suspensões foram purificadas, por extração, com 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), através de centrifugação por 15 min a 7000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA de cada isolado foi transferido para novos tubos e adicionou-se igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (1:1). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para novos tubos de 1,5 mL. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de

isopropanol e centrifugou-se a 12000 rpm por 30 min. Descartado o sobrenadante, o DNA foi lavado duas vezes em etanol 70% e secado por 20 minutos no dessecador. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubados por 1 h a 37°C.

Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm. A leitura de absorbância a 260 nm permitiu a quantificação, e a relação $260_{O.D.}/280_{O.D.}$ forneceu a avaliação da pureza da extração.

2.4.2. Reação de PCR

As reações de PCR foram constituídas de 10-20 ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen, Rockeville, MD, USA), 0,1 µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1 unidade da enzima *Taq* polimerase (Phonectria) e água estéril (MilliQ) suficiente para atingir o volume final de 50 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação de um fragmento de 1,6 Kb correspondente à região rDNA 16S de bactérias P1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e P2 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (30). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler[®] (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de amplificação por 35 ciclos, cada qual constituído por uma etapa de desnaturação do DNA por 1 min a 94°C, anelamento dos oligonucleotídeos por 30 seg a 60°C e extensão por 1 min e 30 seg a 72°C. Após os 35 ciclos, realizou-se uma extensão final a 72°C por 7 min. A fim de confirmar a amplificação, 5 µL do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%) de acordo com técnicas padrão (23).

2.4.3. Análise de restrição dos fragmentos

Após a confirmação da amplificação do DNA, 15 µL da alíquota do produto da amplificação de cada amostra foram clivados separadamente com nove enzimas de restrição *EcoRI*, *RsaI*, *Sau3AI*, *SphI*, *MspI*, *BamHI*, *DdeI*, *TaqI* e

*Hinf*I. Foram adicionados ao produto da amplificação 1 μ L da enzima de restrição e 3 μ L do tampão 10X. Em seguida, a reação foi incubada à temperatura, recomendada pelo fabricante (Promega), específica para cada enzima, por 12 h. Os fragmentos foram novamente separados por eletroforese como descrito no item 2.4.2.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização morfológica dos isolados de rizobactérias

As características morfológicas variaram de acordo com o meio de cultura (523, YMA e Ágar Nutritivo-Glicose) e isolado de rizobactéria. O meio 523 foi o que mais diferenciou entre si os três isolados de *Bacillus subtilis* e os dois de *Pseudomonas* sp., principalmente nas características observadas após 24 h de incubação. Entre as características avaliadas, a coloração e a elevação das colônias no meio 523 foi a que mais distinguiu os isolados: creme e convexa baixa para o isolado S1, creme e chata para o R1, creme claro e convexa baixa para S2, branco gelo e umbilicada para 3918, creme esverdeado e umbilicada para Ca, branca e convexa baixa para CIIb, verde fluorescente e chata para FL2, amarelo esverdeado e convexa baixa para MF2 e creme amarelado e umbilicada para o isolado MF4 (Tabela 1).

O isolado R1 diferenciou-se dos demais pela característica de crescimento, pois foi o único que apresentou crescimento rápido, após 24 h de incubação a 28°C, com tamanho de colônias menores que 1 mm, nos três meios utilizados (Figuras 2 e 3 e Tabela 1). Já as colônias do isolado CIIb, diferiram das demais pelo crescimento puntiforme (tamanho <1 mm), inclusive após 48 h de incubação (Tabela 1 e Tabela 2).

Os isolados S1, S2 e 3918, todos *B. subtilis*, apresentam características morfológicas que os diferenciam entre si e principalmente dos outros isolados. Eles diferem dos demais isolados em duas características: brilho (opaco nos meios YMA e ágar nutritivo, 24 h de incubação) e superfície (pregueada nos três meios, 48 h de incubação) (Tabela 1 e Tabela 2). As principais características que os

separam são: coloração, bordas e superfície. Para o S1, repicado no meio 523, observou-se coloração creme e superfície rugosa nas primeiras 24 h de cultivo, e no meio ágar nutritivo coloração creme claro e superfície lisa. Após 24 h de cultivo, as colônias do isolado S2, repicado para o meio 523, apresentam consistência fluida e superfície lisa, além de uma forma irregular e bordas denticuladas nos meios YMA e ágar nutritivo. Outro *Bacillus*, o isolado 3918, exibiu quando repicado para meio 523, colônias de coloração branco gelo, elevação umbilicada e superfície rugosa. Estas características, após 24 h de incubação diferenciam estes isolados (Figuras 2 e 3 e Tabela 1). Com 48 h de incubação, a superfície das colônias dos isolados de *Bacillus* tornam-se pregueada, entretanto as colônias do isolado S2 apresentam-se brilhantes e de consistência fluida, quando cultivadas no meio 523, características que também diferenciam este isolado dos demais *Bacillus* (Tabela 2).

Para as colônias dos isolados Ca, CIIB, FL2, MF2 e MF4, em todos os meios de cultura testados e em ambas as avaliações, observou-se consistência mucosa e superfície lisa. Os isolados Ca e FL2, após a incubação por 48 h, alteram da cor do meio 523, entretanto as colônias do isolado Ca são brilhantes enquanto as colônias do FL2, possuem brilho translúcido. As características das colônias do isolado MF2, após 24 e 48 h de crescimento, não variam entre os três meios de cultivo testados, exceto a coloração e a elevação das colônias. As colônias do isolado MF4, em meio 523, apresentam coloração creme amarelado característica marcante do isolado, além disto após 24 h de incubação, a elevação das colônias é umbilicada e a estrutura classificada como granulosa (Figura 3 e Tabela 1).

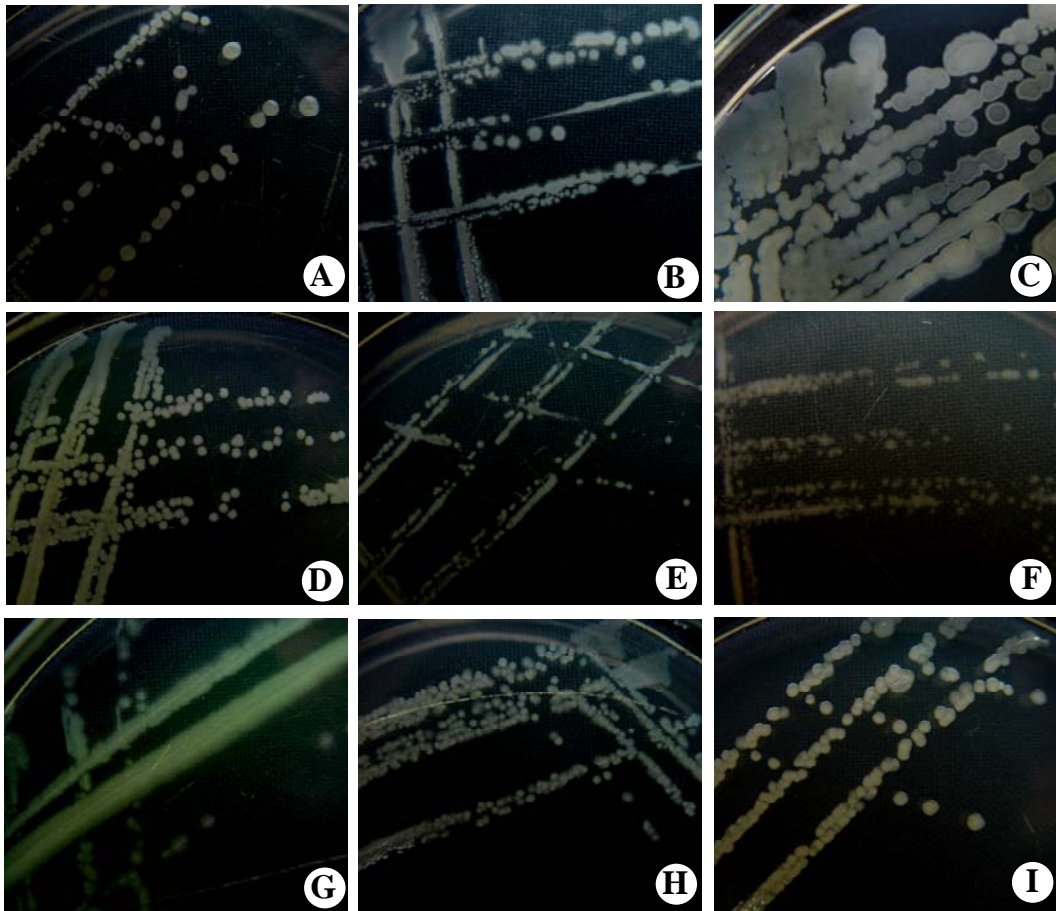


Figura 2. Isolados de rizobactérias cultivadas em meio 523, após 24 h de incubação. (A) isolado S1 - *Bacillus subtilis*; (B) S2 - *B. subtilis*; (C) 3918 - *B. subtilis*; (D) Ca - *Pseudomonas fulva*; (E) CIIb - *Stenotrophomonas maltophilia*; (F) R1 - *Frateuria aurantia*; (G) FL2 - *P. aeruginosa*; (H) MF2 - *Pseudomonas* sp. e (I) MF4 - *Pseudomonas* sp.

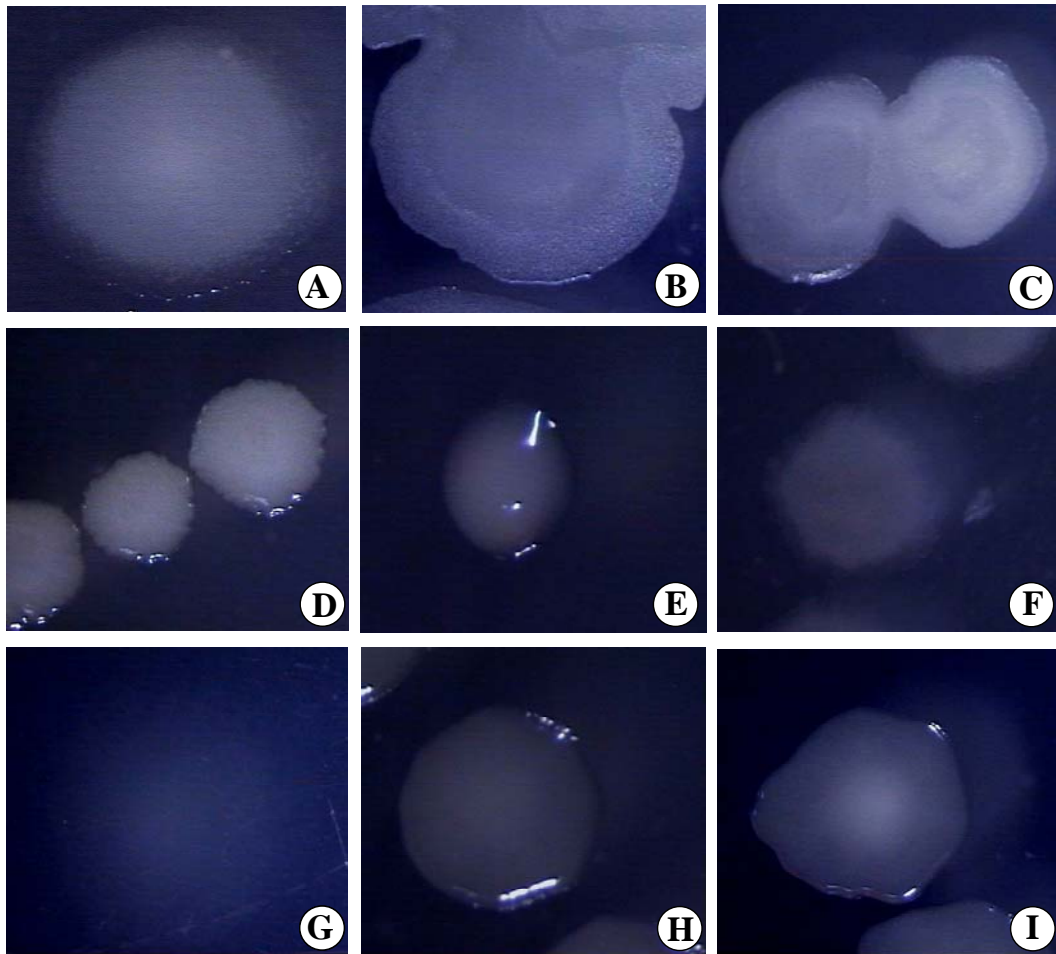


Figura 3. Colônias de rizobactérias cultivadas em meio 523, após 24 h de incubação. (A) isolado S1 - *Bacillus subtilis*; (B) S2 - *B. subtilis*; (C) 3918 - *B. subtilis*; (D) Ca - *Pseudomonas fulva*; (E) CIIb - *Stenotrophomonas maltophilia*; (F) R1 - *Frateruria aurantia*; (G) FL2 - *P. aeruginosa*; (H) MF2 - *Pseudomonas* sp. e (I) MF4 - *Pseudomonas* sp.

Tabela 1. Caracterização morfológica dos isolados de rizobactérias, determinada após 24 h de incubação, em meio 523, YMA e ágar nutritivo-glicose, em estado sólido.

Isolado	Meio de cultivo	Características morfológicas									
		Elevação	Forma	Estrutura	Bordas	Coloração	Brilho	Crescimento	Tamanho	Consistência	Superfície
S1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Convexa baixa	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme	Brilhante	Muito rápido	>3 mm	Mucosa	Rugosa
	YMA	Chata	Circular	Amorfa	Lobados	Branca	Opaco	Muito rápido	>3 mm	Seca	Rugosa
	Ágar Nutritivo	Espraiada	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Opaco	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
S2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Convexa baixa	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Muito rápido	>3 mm	Fluida	Lisa
	YMA	Chata	Irregular	Amorfa	Denticulados	Creme	Opaco	Muito rápido	>3 mm	Seca	Rugosa
	Ágar Nutritivo	Espraiada	Irregular	Amorfa	Denticulados	Creme	Opaco	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Rugosa
3918 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Umbilicada	Circular	Amorfa	Inteiros	Branco gelo	Brilhante	Muito rápido	>3 mm	Fluida	Rugosa
	YMA	Chata	Irregular	Amorfa	Ondulados	Branca	Opaco	Muito rápido	>3 mm	Seca	Rugosa
	Ágar Nutritivo	Chata	Irregular	Amorfa	Ondulados	Creme claro	Opaco	Muito rápido	2-3 mm	Seca	Rugosa
Ca (<i>Pseudomonas fulva</i>)	Meio 523	Umbilicada	Circular	Filamentosa	Ondulados	Creme esverdeado	Brilhante	Muito rápido	>3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Chata	Irregular	Filamentosa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Muito rápido	>3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Convexa baixa	Irregular	Filamentosa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
CIIB (<i>Sterotrophomonas maltophilia</i>)	Meio 523	Convexa média	Circular	Amorfa	Inteiros	Branca	Brilhante	Muito rápido	<1 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa alta	Circular	Granulosa	Inteiros	Branca	Brilhante	Muito rápido	<1 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Convexa alta	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Muito rápido	<1 mm	Mucosa	Lisa
R1 (<i>Frateuria aurantia</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Filamentosa	Denticulados	Creme	Brilhante	Rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Chata	Circular	Filamentosa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Rápido	>1 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Chata	Circular	Filamentosa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Rápido	>1 mm	Mucosa	Lisa
FI2 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Verde fluorescente	Translúcido	Muito rápido	>3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Chata	Circular	Granulosa	Inteiros	Amarelo alaranjado	Translúcido	Muito rápido	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Chata	Circular	Granulosa	Inteiros	Amarelo alaranjado	Translúcido	Muito rápido	>3 mm	Mucosa	Lisa
MF2 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Meio 523	Convexa baixa	Circular	Granulosa	Inteiros	Amarelo esverdeado	Brilhante	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Centro saliente	Circular	Granulosa	Inteiros	Creme	Brilhante	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Umbilicada	Circular	Granulosa	Inteiros	Creme escuro	Brilhante	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa
MF4 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Meio 523	Umbilicada	Circular	Granulosa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Muito rápido	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa média	Circular	Filamentosa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Muito rápido	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Centro saliente	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Muito rápido	1-2 mm	Mucosa	Lisa

Tabela 2. Caracterização morfológica de isolados de rizobactérias, determinada após 48 h de incubação, em meio 523, YMA e ágar nutritivo-glicose, em estado sólido.

Isolado	Meio de cultivo	Características morfológicas									
		Elevação	Forma	Estrutura	Bordas	Coloração	Brilho	ACM	Tamanho	Consistência	Superfície
S1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
	YMA	Chata	Circular	Amorfa	Denticulados	Branca	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
	Ágar Nutritivo	Chata	Circular	Amorfa	Denticulados	Creme claro	Opaco	Negativo	>3 mm	Mucosa	Pregueada
S2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Negativo	>3 mm	Fluida	Pregueada
	YMA	Chata	Irregular	Amorfa	Denticulados	Creme	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
	Ágar Nutritivo	Chata	Irregular	Amorfa	Denticulados	Creme	Brilhante	Negativo	>3 mm	Mucosa	Pregueada
3918 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Amorfa	Denticulados	Branco gelo	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
	YMA	Chata	Irregular	Amorfa	Ondulados	Branca	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
	Ágar Nutritivo	Chata	Irregular	Amorfa	Ondulados	Creme claro	Opaco	Negativo	>3 mm	Seca	Pregueada
Ca (<i>Pseudomonas fulva</i>)	Meio 523	Centro saliente	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme esverdeado	Brilhante	Amarelo	>3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa baixa	Irregular	Filamentosa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Convexa baixa	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
CIIB (<i>Sterotrophomonas maltophilia</i>)	Meio 523	Convexa alta	Circular	Amorfa	Inteiros	Branca	Brilhante	Negativo	<1 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa média	Circular	Amorfa	Inteiros	Branca	Brilhante	Negativo	<1 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Convexa alta	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Negativo	<1 mm	Mucosa	Lisa
R1 (<i>Frateuria aurantia</i>)	Meio 523	Espraiada	Circular	Granulosa	Denticulados	Creme	Brilhante	Negativo	1-2 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa baixa	Circular	Filamentosa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Negativo	1-2 mm	Seca	Lisa
	Ágar Nutritivo	Chata	Circular	Filamentosa	Inteiros	Creme claro	Brilhante	Negativo	<1 mm	Mucosa	Lisa
FI2 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Meio 523	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Amarelo fluorescente	Translúcido	Amarelo	>3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Amarelo alaranjado	Translúcido	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Chata	Circular	Amorfa	Inteiros	Amarelo alaranjado	Translúcido	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
MF2 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Meio 523	Centro saliente	Circular	Amorfa	Inteiros	Amarelo esverdeado	Brilhante	Negativo	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa média	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme	Brilhante	Negativo	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Convexa baixa	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme escuro	Brilhante	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
MF4 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Meio 523	Convexa baixa	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Negativo	2-3 mm	Mucosa	Lisa
	YMA	Convexa média	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Negativo	>3 mm	Mucosa	Lisa
	Ágar Nutritivo	Centro saliente	Circular	Amorfa	Inteiros	Creme amarelado	Brilhante	Negativo	2-3 mm	Mucosa	Lisa

3.2. Sensibilidade dos isolados de rizobactérias a antibióticos

O pefloxacin foi o único dos antibióticos testados que inibiu todos os isolados de rizobactérias. Em contrapartida, os isolados testados foram insensíveis à penicilina, exceto o R1 que apresentou halo de inibição. Este isolado foi insensível apenas aos antibióticos oxacilina, aztreonam e rifampicina.

O isolado FL2 foi o único isolado insensível a amicacina, amonicilina+ác. clavulanico, cefepime, cefotaxima e norfloxacin e o menos sensível, sendo que os antibióticos pefloxacin, ácido pipemidico, estreptomina, tetraciclina e sulfonamida inibiram o crescimento do isolado.

Sulfazotrim, clindamicina e vancomicina inibiram os isolados S1, S2, 3918, R1 e CIIb, sendo os demais isolados insensíveis. O antibiótico oxacilina inibiu somente o crescimento dos isolados de *B. subtilis* (S1, S2 e 3918). O isolado S2 demonstrou-se mais sensível aos antibióticos testados, com exceção dos antibióticos penicilina e cefalexina, que não inibiram o seu crescimento.

Os antibióticos rifampicina, tobramicina e tetraciclina inibiu somente o isolado S2, diferenciando-o dos isolados S1 e 3918. Aztreonam, cefalotina e ceftazidima inibiram o crescimento dos isolados S2 e 3918, em contrapartida eritromicina, nitrofurantoína, ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina e ácido pipemidico inibiram o crescimento dos isolados S1 e S2.

Treze antibióticos testados inibiram o crescimento dos isolados MF2 e MF4. Os antibióticos nitrofurantoína, amoxicilina e neomicina inibiram somente o isolado MF2. Os antibióticos ácido pipemidico, ticarcilina + ácido clavulanico, tetraciclina, sulfonamida e estreptomina inibiram o crescimento do isolado MF4 sem afetar a multiplicação do isolado MF2.

Para os antibióticos vancomicina, tobramicina, cefalexina, amoxicilina, neomicina e tetraciclina observou-se a presença de halo duplo de inibição, o que sugere o crescimento de células com maior tolerância ao principio ativo destes antibióticos, nos isolados S1, S2, 3918 e MF2 (Tabela 3).

Tabela 3. Sensibilidade dos isolados de rizobactérias em relação aos antibióticos testados.

Antibiótico			Isolado de rizobactéria								
Nome comercial	Código	Concentração	S1	S2	3918	Ca	CIIb	R1	FL2	MF2	MF4
Pefloxacin	PEF	5mcg	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicilina G	PEN	10U	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Amicacina	AMI	30µg	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Amonicilina + Ác.Clavulanico	AMC	30mcg	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Cefepime	COM	30µg	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Cefotaxima	CTX	30mcg	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Norfloxacin	NOR	10µg	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sulfazotrim	SUT	25µg	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Clindamicina	CLI	2µg	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Vancomicina	VAN	30mcg	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Oxacilina	OXA	1µg	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Rifampicina	RIF	5µg	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Tobramicina	TOB	10µg	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Aztreonam	ATM	30µg	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Cefalotina	CFL	30µg	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Ceftazidima	CAZ	30µg	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Cefalexina	CFX	30mcg	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Ampicilina	AMP	10µg	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Cloranfenicol	CLO	30µg	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Eritromicina	ERI	15µg	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Nitrofurantoína	NIT	300µg	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Amoxicilina	AMO	10µg	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Ácido pipemidico	PIP	20mcg	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Estreptomicina	EST	10mcg	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Neomicina	NEO	30mcg	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Tetraciclina	TET	30µg	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Ticarcilina + Ác.Clavulanico	TIC	85mcg	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Sulfonamida	SUL	300µg	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Ausência de halo de inibição (-);

Presença de halo de inibição (+);

Sinais positivos de cor vermelha indicam a presença de duplo halo de inibição.

3.3. Caracterização molecular

A amplificação por PCR da região 16S do rDNA de rizobactérias, gerou fragmentos de aproximadamente 1,6 kb para todos os isolados (Figura 4). A análise de restrição destes fragmentos, utilizando-se nove enzimas, diferenciou o grupo dos isolados de *Bacillus* (3918, S1 e S2) e o grupo das *Pseudomonas* (MF2, MF4 e Ca) dos demais isolados de rizobactérias (Figura 5). Entretanto, a análise não diferenciou entre si os isolados dos grupos formados. Os demais isolados foram diferenciados entre si por pelo menos uma enzima.

Entre os isolados testados, CIIb mostrou-se o mais divergente, sendo que seis das nove enzimas de restrição utilizadas resulta em perfis de restrição que separa dos demais isolados. O isolado FL2 pôde ser diferenciado dos demais, pelas enzimas *Sau3AI*, *MspI*, *BamHI*, *DdeI* e *TaqI* (Figuras 5C, E, G e I, respectivamente).

As enzimas *Sau3AI* e *MspI* permitiu a separação o maior número de isolados (Figura 5C, E, respectivamente). Os grupos formados por estas enzimas foram o dos isolados S1, S2 e 3918 clivado em várias regiões para ambas as enzimas. Outro grupo diferenciado é composto pelos isolados MF2, MF4 e Ca com a enzima *Sau3AI* obteve fragmento de 900 bp e na clivagem com a enzima *MspI* apresentou dois fragmentos de aproximadamente 600 e 500 bp. Os isolados CIIb, R1 e FL2 foram diferenciado em ambas as enzimas.

A enzima de restrição *EcoRI* separou os isolados em três grupos. Os isolados S1, S2, 3918 e R1 com fragmentos de aproximadamente 900 e 700 bp, diferindo do isolado CIIb que obteve fragmentos de 900 e 600 bp e dos isolados Ca, FL2, MF2 e MF4 na qual a região amplificada não foi clivada pela enzima (Figura 5A). Os mesmos grupos foram também separados através da clivagem dos fragmentos com a enzima *SphI* (Figura 5D). Já os isolados R1 e CIIb foram agrupados pela enzima *RsaI*, com três fragmentos próximos de 350 a 550 bp e dois fragmentos com 500 e 850 bp, respectivamente (Figura 5B).

A clivagem dos fragmentos dos isolados FL2 e R1 com a enzima *TaqI* foi diferente dos demais isolados. A *TaqI* também diferenciou dois

grupos, um os isolados S1, S2 e 3918 e o outro grupo formado pelos isolado Ca, CIIb, MF2 e MF4 (Figura 5I).

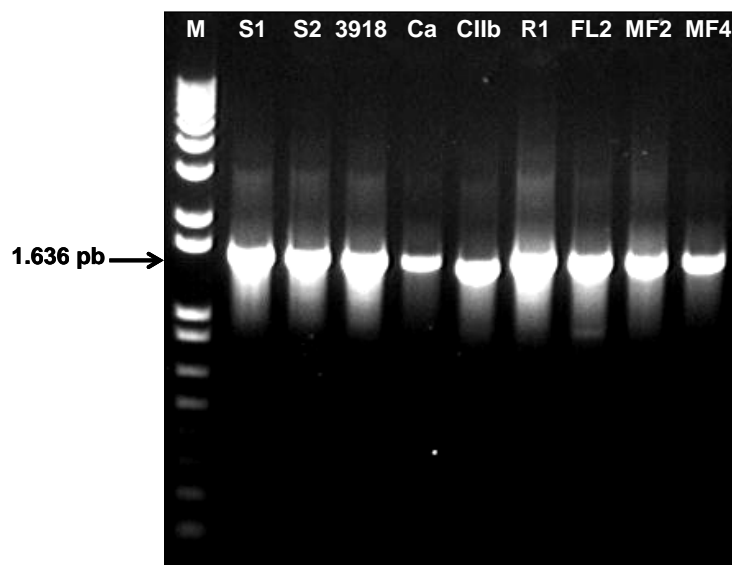


Figura 4. Fragmentos de DNA amplificados por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos P1 e P2. (M) – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (S1) - *Bacillus subtilis*; (S2) – *B. subtilis*; (3918) – *B. subtilis*; (Ca) - *Pseudomonas fulva*; (CIIb) - *Stenotrophomonas maltophilia*; (R1) - *Frateuria aurantia*; (FL2) – *P. aeruginosa*; (MF2) - *Pseudomonas* sp. e (MF4) - *Pseudomonas* sp.

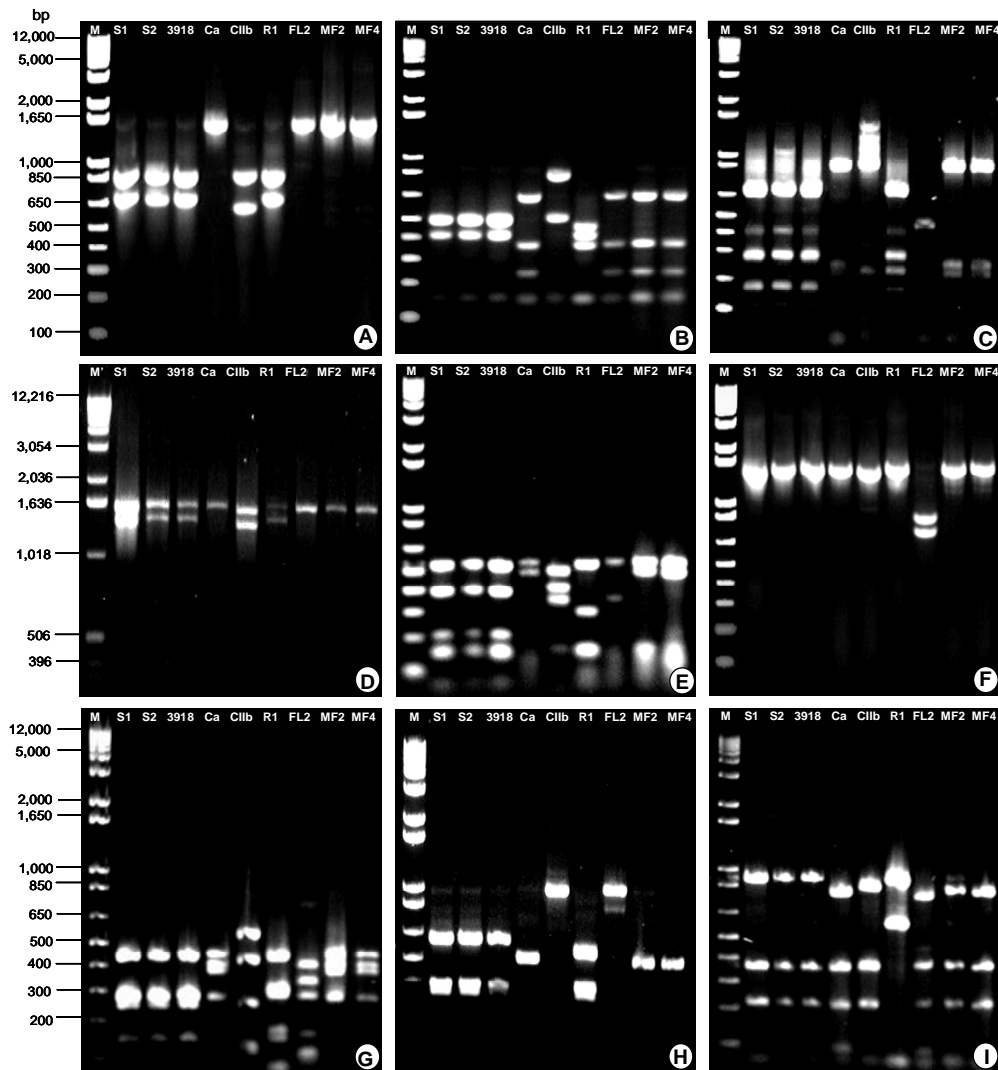


Figura 5. Perfil de restrição do fragmento amplificado da região 16S do rDNA de nove isolados de rizobactérias. (A) - clivagem dos fragmentos com a enzima de restrição *EcoRI*; (B) clivagem com a enzima de restrição *RsaI*; (C) clivagem com a enzima de restrição *Sau3AI*; (D) clivagem com a enzima de restrição *SphI*; (E) clivagem com a enzima de restrição *MspI*; (F) clivagem com a enzima de restrição *BamHI*; (G) clivagem com a enzima de restrição *DdeI*; (H) clivagem com a enzima de restrição *HinfI*; (I) clivagem com a enzima de restrição *TaqI*; (M) – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (M') – 1 Kb Ladder (Invitrogen);

4. DISCUSSÃO

Nove isolados de rizobactérias promotoras de enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto, foram avaliados quanto às características morfológicas, molecular e a sensibilidade a antibióticos visando à diferenciação entre os isolados e a detecção de contaminantes no processo de produção do inoculante. A caracterização dos isolados é fundamental para o processo de produção destes microrganismos em larga escala, auxiliando no controle de qualidade do produto *Rizolyptus*[®], garantindo o efeito benéfico da rizobacterização na propagação clonal do eucalipto verificado em experimentos anteriormente realizados.

Todos os isolados foram diferenciados por suas características morfológicas e pela sensibilidade a diferentes antibióticos. As características morfológicas dos isolados variam em relação ao meio de cultura utilizado e ao tempo de incubação, o crescimento dos isolados variam de acordo com o antibiótico e o isolado de rizobactéria testado e em alguns casos, a presença do antibiótico resulta em multiplicação de células resistentes, observado pela formação do halo duplo de inibição.

Os antibióticos são usados para várias finalidades e são amplamente empregados na cultura de tecidos com objetivo de evitar contaminações microbianas dos meios de cultura e têm sido recomendados para a erradicação de fitobactérias de sementes (21). Além disso, antibióticos são utilizados em meio seletivo e permite a contagem das unidades formadoras de colônias. A título de exemplo, um mutante P7^{nif}, de *Pseudomonas fluorescens*, foi selecionado em ágar nutriente acrescido de rifampicina (100 µg/mL) de acordo com características morfológicas da colônia, pigmentação

e antagonismo a patógenos similares aos tipos selvagens de rizobactérias. Após a escolha do mutante, foi monitorada a dinâmica populacional em plantas de ervilhas no campo e observada a estabilidade ao longo do tempo da concentração de bactérias e o alto nível populacional, resultante principalmente da eficiente colonização das raízes (32).

A adição de antibiótico ao meio de cultura utilizado na produção do inoculante é uma alternativa que reduz os riscos de contaminação ou troca de isolados, sendo que para o isolado MF2 a utilização do antibiótico sulfonamida (300µg), inibi o crescimento dos demais isolados. Da mesma maneira o uso de um dos antibióticos amicacina (30µg), amonicilina+ác. clavulânico (30mcg), cefepime (30µg), cefotaxima (30mcg) ou norfloxacin (10µg) não altera o crescimento do isolado FL2. Os antibióticos testados podem ainda serem utilizados para diferenciar os isolados de *Bacillus* e de *Pseudomonas*, confirmando através das características morfológicas a identidade de cada isolado.

As características morfológicas dos isolados determinada em três meios de cultura, além de diferenciarem todos os isolados é uma ferramenta adicional para a detecção de microrganismos contaminantes. Entretanto, as características morfológicas e a resistência a antibióticos são técnicas que mesmo sendo essenciais em um programa de qualidade, por caracterizarem rapidamente os isolados e possuírem baixo custo, apresentam resultados subjetivos, como coloração das colônias, forma de bordas e diferentes respostas a inibição em relação às concentrações dos antibióticos. Desta forma, as técnicas moleculares que são mais sensíveis e podem detectar diferenças no genoma devem ser utilizadas como técnica complementar no controle de qualidade.

Técnicas moleculares têm sido amplamente empregadas nos estudos de taxonomia e diversidade de bactérias (1, 4, 6, 10, 12, 19, 22, 24-26, 31). A análise de PCR, que permite a amplificação de seqüências definidas da molécula do DNA, associada ao método do RFLP, em geral, com amplificações de regiões de genes cromossômicos conservados, mas com variabilidade suficiente para detectar diferenças entre gêneros e espécies, como o 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaço intergênico (ITS) entre estas duas regiões, vem se destacando como um método que permite diferenciar

indivíduos, inclusive, de espécies geneticamente relacionadas (8). Para a caracterização molecular dos isolados de rizobactérias, optou-se pela técnica denominada PCR-RFLP por ser um método sensível e confiável, amplamente utilizado, altamente reproduzível e relativamente de fácil execução.

Os resultados obtidos na análise molecular foram similares aos de outros autores que diferenciaram microrganismos pela técnica PCR-RFLP (4, 6, 10, 22, 25). A clivagem das seqüências parciais da região 16S do DNA ribossomal permitiu diferenciar os grupos de *Bacillus* (S1, S2 e 3918), de *Pseudomonas* (MF2, MF4 e Ca) dos isolados CIIb, R1 e FL2. Nenhum dos perfis de restrição observado diferenciou entre si os isolados S1, S2 e 3918, todos da espécie *B. subtilis*, e os isolados MF2, MF4 e Ca do gênero *Pseudomonas*, provavelmente devido a região 16S do DNA ribossomal destas espécies ser altamente conservada, não sendo detectada diferenças neste fragmento quando digerida pelas nove enzimas de restrição utilizadas. Tassa e Duarte (26), também não obtiveram sucesso, na separação das subespécies, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e outras pectobactérias disponíveis no GenBank, devido à baixa especificidade apresentada pelo gene *recA* amplificado e digerido por enzimas. No entanto, a clivagem com *HhaI* e *TasI* permitiu a separação de 13 grupos distintos e somente a discriminação de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* destes grupos.

Para separação entre os isolados de *B. subtilis* e de *Pseudomonas* pode-se utilizar a mesma técnica molecular, entretanto amplificando as regiões espaçadoras (ITS) entre genes rDNA. Como as mutações dentro das regiões espaçadoras ocorrem com maior frequência que com os genes ribossomais, estas regiões são de grande utilidade para a separação entre espécies (6, 12, 27). Um exemplo é a diferenciação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Tipo A de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipos B e C e de *X. axonopodis* pv. *citrumela* Tipo E, agentes causais de várias doenças em citrus, por meio da amplificação da região ITS entre 16S e 23S e posterior clivagem com enzimas de restrição *DdeI*, *AluI* e *Sau3AI* (4).

Os isolados Ca e FL2, apesar de serem do mesmo gênero, *Pseudomonas*, possuem características morfológicas distintas,

principalmente, em relação a brilho e elevação das colônias e também podem ser facilmente diferenciadas pela análise molecular que demonstrou após a clivagem com as enzimas de restrição *Sau3AI*, *MspI*, *DdeI*, *BamHI* e *TaqI* diferentes perfis de restrição para a região amplificada do genoma. Estas bactérias pertencem a espécies diferentes de *Pseudomonas* o que facilita na separação de forma análoga as espécies, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Frateuria aurantia*, isolados CIIb e R1, respectivamente.

De maneira geral, as técnicas moleculares são mais sensíveis às diferenças dos isolados e os resultados são mais confiáveis por expressarem pequenas diferenças no genoma do indivíduo, e por isso, trazem maior segurança ao resultado, ao contrário das características morfológicas e da sensibilidade a antibióticos que podem resultar em respostas subjetivas. Entretanto, em um processo de produção de microrganismos em larga escala o conhecimento de várias técnicas que se complementem é importante pré-requisito para o desenvolvimento de um programa de qualidade, sendo assim, a utilização dos resultados apresentados neste trabalho, ferramentas indispensáveis para que se possa garantir a pureza e a autenticação do isolado no produto comercializado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carlotti, A.; Funke, G. (1994). Rapid distinction of *Brevibacterium* species by restriction analysis of rDNA generated by polymerase chain reaction. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 380-386.
2. Chanway, C.P., Turkington, R.; Holl, F.B. (1991). Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. *Advances in Ecological Research*, 21, 121-169.
3. Davison, J. (1988). Plant beneficial bacteria. *BioTechniques*, 6, 282-286.
4. Destéfano, S.A.L.; Rodrigues Neto, J. (2002). Rapid differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants by PCR-RFLP of the 16S-23S rDNA spacer region. *Summa Phytopathologica*, 28, 167-172.
5. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J.; Yaacov, O. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 107-149.
6. Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N.; Alabouvette, C. (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) - amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research*, 101, 179-187.
7. Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M.B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H.; Trevors, J.T. (1999). Application of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 35, 187-199.

8. Fernandes, M.F., Fernandes, R.P.M.; Hungria, M. (2003). Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 911-920.
9. Geiser, D.M., Arnold, M.L.; Timberlake, W.E. (1994). Sexual origins of British *Aspergillus nidulans* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 2349-2352.
10. Gibotti, A., Tanaka, T.L., Oliveira, V.R., Taddei, C.R.; Martinez, M.B. (2004). Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* ipa genes by PCR-RFLP analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 74-80.
11. Graves, L.M.; Swaminathan, M. (1993). IN Diagnostic molecular microbiology: principles and application (Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C.; White, B. E., Eds.), pp. 325-328, American Society for Microbiology, Washington.
12. Iwen, P.C., Hinrichs, S.H.; Rupp, M.E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Myc*, 40, 87-109.
13. Kado, E.I.; Heskett, M.G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-976.
14. Kloepper, J.W., Lifshitz, R.; Zablotowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*, 7, 39-43.
15. Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. (1978) IN INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA (ANGERS, Ed.), Vol. 4, pp. 879-882, Angers.
16. Ladeira, M.C.G. (2004) Controle biológico de *Quambalaria eucalypti* mediado por rizobactérias. Departamento de Fitopatologia, pp. 45, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
17. Mafia, R.G. (2004) Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto. Departamento de Fitopatologia, pp. 118, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

18. Mariano, R.L.R. (2000). *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. Editora Universitária, UFPE, Recife, PEp.
19. Radu, S., Ling, O.W., Rusul, G., Karim, M.I.A.; Nishibuchi, M. (2001). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *Journal of Microbiological Methods*, 46, 131-139.
20. Reis Junior, F.B., Mendes, I.C., Teixeira, K.R.S.; Reis, V.M. (2002). *Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo*, Planaltina, DFp.
21. Romeiro, R.S. (2001). *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Editora UFV, Viçosa, 279pp.
22. Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A.; Guillamón, J.M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1981-1987.
23. Sambrook, J., Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*, New York.
24. Shah, S.A.; Romick, T.L. (1997). Subspecies differentiation of *Salmonella* by PCR-RFLP of the ribosomal operon using universal primers. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 54-57.
25. Sikora, S.; Redzepovic, S. (2003). Genotypic characterization of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technology Biotechnology*, 41, 61-67.
26. Tassa, S.O.M.; Duarte, V. (2006). Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do Gene recA. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 23-28.
27. Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A.; Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 126-146.
28. Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G., Ferreira, E.M., Siqueira, L., Maffia, L.A.; Mounteer, A.H. (2007). Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 1-6.

29. Vincent, R.D., Geowart, R., Goldman, W.E., Kobayashi, G.S., Lambowitz, A.M.; Medoff, G. (1986). Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragments polymorphisms. *Journal Bacteriology*, 165, 813-818.
30. Weinsburg, W.G., Barns, S.M.; Pelletier, D.A. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*, 173, 697-703.
31. White, T.J., Bruns, T., Lee, S.; Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. New York, 315-322p.
32. Xi, K., Stephens, J.H.G.; Verma, P.R. (1996). Application of formulated rhizobacteria against root rot of field pea. *Plant Pathology*, 45, 1150-1158.

**Eficiência de duas formulações de rizobactérias no
enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de
eucalipto**

Talyta G. Zarpelon¹; Luis A. Maffia¹; Poliane Alfenas-Zerbini¹; Eli S. Lopes²; Acelino C. Alfenas¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil; ²Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas

RESUMO

Avaliou-se a viabilidade de rizobactérias, nas formulações líquida e turfosa, e seus efeitos sobre o enraizamento de miniestacas de eucalipto. Para a definição do tempo de prateleira dos inoculantes, armazenados à temperatura ambiente, monitorou-se a sobrevivência do inóculo durante 180 dias. Os isolados apresentaram concentração bacteriana em torno de 1×10^{10} u.f.c./mL para a formulação líquida e de 3×10^9 u.f.c./mL para a formulação turfosa. Comparou-se, em miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409) e *E. grandis* (11), a eficiência dessas formulações com o tratamento na base das estacas com ácido indolbutírico (AIB) e em relação à testemunha. A partir do 18º dia após o estaqueamento, avaliou-se o número de miniestacas contendo raízes por baixo do tubete e aos 60 dias avaliou-se a biomassa do sistema radicular e da parte aérea. O tratamento com AIB não foi eficiente em aumentar a velocidade de enraizamento em relação à testemunha e aos oito isolados testados. Obteve-se maior incremento de

enraizamento entre 21 a 27 dias após o estaqueamento para todos os isolados. O isolado S2, de *Bacillus subtilis*, destacou-se dos demais tratamentos para os dois clones nas duas formulações testadas, quando se avaliou a biomassa da parte aérea e das raízes. A eficiência dos inoculantes variou de acordo com o clone, tipo de formulação e isolado testado. Em média, o clone de *E. grandis* respondeu melhor à rizobacterização que o de *E. grandis* x *E. urophylla*. A formulação turfosa propiciou maiores incrementos para velocidade de enraizamento, biomassa da parte aérea e do sistema radicular.

Palavras-chave: Rizobactérias, *Eucalyptus*, formulação, turfa.

ABSTRACT

ZARPELON, Talyta Galafassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Efficiency of two rhizobacteria formulations in eucalyptus minicutting rooting and seedling growth.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Adviser: Luiz Antônio Maffia and Poliane Alfenas-Zerbini.

Rhizobacteria survival in liquid and turf formulations and their effects on eucalyptus minicutting rooting was evaluated. The inoculant survival was monitored for 180 days in order to define the inoculant shelf life at room temperature. The isolates had bacterial concentration around 1×10^{10} u.f.c./m for the liquid formulation and of 3×10^9 u.f.c. /mL for the turf formulation, with adequate survival for inoculant use within this storage period. Formulation efficiency was compared with the treatment of cuttings with indolbutiric acid (IBA) and with the control (without both rhizobacteria and IBA). Minicuttings of two clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409) and *E. grandis* (11) were planted after inoculant incorporation into the rooting substrate. Beginning at the 18th day after cutting propagation and every three days, 8 evaluations for the number of minicuttings with roots underneath the tubes were carried out, and at the 60th day, the biomass of root system and aerial part was evaluated. The IBA treatment was not efficient in increasing rooting speed and rooting percentage compared with the control and the eight isolates of the tested rhizobacteria. The isolates MF2 of *Pseudomonas* sp., R1 of *Frateria aurantia*, S1 of *Bacillus subtilis*, 3918 of *Bacillus subtilis* and FL2 of *P. aeruginosa*, in both formulations, stood out for a larger rooting increase between 21 and 27 days after cutting propagation and, in the following evaluation periods, the increase between

evaluations showed no significant differences. The isolate S2 of *B. subtilis* stood out from the other treatments, for the two clones with the two tested formulations, when evaluating the biomass of aerial part and roots. On average, the turf formulation was more efficient in inducing eucalyptus minicutting rooting and seedling growth. Inoculant efficiency varied with clone, type of formulation and tested isolate. On average, clones of *E. grandis* (11) gave better response to rhizobacterization than *E. grandis* x *E. urophylla* (409). The turf formulation provided larger increases for the variables rooting speed, biomass of aerial part and root system. The isolates R1, FL2, S1 and S2 stood out as the most efficient in inducing minicutting rooting and the isolate S2 in inducing seedling growth, expressed by the increase in biomass of aerial part and root system.

Key words: Rhizobacteria, *Eucalyptus*, formulations, turf

1. INTRODUÇÃO

Bactérias que exercem efeito benéfico às plantas são denominadas de “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – PGPR”, ou seja, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (8, 13, 14), que inclui diferentes espécies pertencentes a diversos gêneros, como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydroganophaga*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Azospirillum* (2).

Além de serem utilizadas para promover o crescimento de plantas (6, 10, 22, 26, 28), alguns outros benefícios incluem o controle biológico de doenças (1, 3, 19), aumento da produção (11, 17, 21, 22) e indução de resistência a patógenos foliares (23, 29).

A partir de uma série de estudos iniciados no final da década de 90, têm sido comprovados os efeitos benéficos das rizobactérias em promover o enraizamento, o crescimento de mudas (20, 21, 27, 28) e o controle biológico de doenças que afetam a propagação clonal do eucalipto (18, 27, 29). Dentre 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de *Eucalyptus*, que se destacaram quanto ao potencial de enraizamento de miniestacas de eucalipto, oito foram identificados como pertencentes às espécies de *Bacillus subtilis* (S1, S2 e 3918), *Pseudomonas fulva* (Ca), *Pseudomonas aeruginosa* (FL2), *Frateuria aurantia* (R1) e *Pseudomonas* sp. (MF2 e MF4), baseando-se nas seqüências parciais da região 16S do DNA ribossomal (28).

Além de estimular o enraizamento (28), a aplicação de rizobactérias no substrato de enraizamento propiciou uma maior uniformidade na altura das mudas e uma melhor arquitetura do sistema radicular. Esses isolados

também exerceram efeito positivo sobre a produção de biomassa radicular, produção de brotos para estaquia em minicepas de eucalipto estabelecidas em leito de areia e produtividade de minijardins clonais (número de miniestacas x porcentagem de enraizamento) (21).

Os isolados mais promissores foram testados em escala semi-operacional, em diversos viveiros florestais e inoculados em diferentes composições de substrato, obtendo incremento em biomassa radicular e da parte aérea, maior velocidade de enraizamento e controle de doenças. Nesses experimentos de rizobactérias com eucalipto (18, 20, 21, 27-29) e com outras culturas (3, 9, 15, 17, 25) utilizaram-se suspensões bacterianas, produzidas em meio de cultura. Entretanto, este tipo de inóculo é de difícil produção em grande escala, apresentando dificuldades na manipulação, no transporte, armazenamento e baixa viabilidade da suspensão bacteriana ao longo do tempo.

Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma formulação para veicular as rizobactérias e facilitar sua aplicação. Através de uma parceria, entre a UFV e a Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas, desenvolveram-se duas formulações, sólida e líquida, para veicular os isolados de rizobactérias benéficas na produção de mudas clonais de eucalipto, cujo produto passou a denominar-se *Rizolyptus*[®]. A fim de viabilizar o emprego desse inoculante em ampla escala, o presente trabalho foi realizado objetivando testar a viabilidade do inoculante armazenado (“shelf life”) e seus efeitos sobre a rizogênese de miniestacas e o crescimento de mudas de eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Formulações

Utilizou-se oito isolados de rizobactérias em duas formulações, líquida e turfosa, preparadas pela Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas (São Joaquim da Barra - SP). Os isolados denominados de S1, S2 e 3918 pertencem a espécie *Bacillus subtilis* Cohn, 1872, o isolado Ca foi determinado como da espécie *Pseudomonas fulva* Lizuga & Komagata, 1963, o isolado FL2 de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900, o isolado CIIb é da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh, 1872) Palleroni & Bradbury, 1993, o isolado R1 de *Frateuria aurantia* Swings et al., 1980 e os isolados MF2 e MF4 foram identificados como *Pseudomonas* sp. Migula, 1894 (28).

2.2. Viabilidade dos isolados de rizobactérias nas formulações líquida e turfosa

Avaliou-se pela técnica de micro-gotas (24), a concentração de células bacterianas dos isolados de rizobactérias formulados pela Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas e armazenados em embalagem apropriada à temperatura ambiente a cada 20 dias, durante 180 dias. A partir de 1 g da formulação turfosa ou 1 mL do formulação líquida, de cada isolado, adicionados em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%), seguiu-se a diluição (10^{-1} a 10^{-8}) da amostra. Aliquotas de 10 μ L de cada diluição foram semeadas em placas de Petri, contendo meio 523 (12) e em seguida, foram incubadas a 28°C, no escuro, durante 12 a 24 h dependendo do isolado, até o

aparecimento das colônias. Para cada diluição foram realizadas cinco réplicas.

2.3. Eficiência do produto *Rizolyptus*[®] sobre o enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto

Os inoculantes, nas formulações turfosa e líquida, foram aplicados diretamente e aos poucos na mistura do substrato de enraizamento, previamente homogêneo, na proporção de 1 g (formulação turfosa) ou 1 mL (formulação líquida) por 50 mL de substrato. Este era composto de substrato agrícola Mec Plant[®], vermiculita expandida fina, palha de arroz carbonizada, na proporção de 2:4:4, enriquecido com 21 g de FTE (micronutrientes em fritas), 500 g de superfosfato simples, 21 g de sulfato de amônio e 40 g de cloreto de potássio por m³. O substrato sem a adição de inoculante foi utilizado como testemunha. Miniestacas tratadas na base com ácido indolbutírico (AIB) a 6000 ppm, veiculado em talco, serviu como comparador. Os inoculantes foram testados em dois clones de eucalipto: 409 (híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*) e 11 (*E. grandis*) e as repetições em cada bandeja foram identificadas por clone e tratamento. Após o estaqueamento, as miniestacas foram mantidas em casa de enraizamento com cobertura plástica translúcida, nebulização intermitente e temperatura em torno de 30°C, por 36 dias. Após este período, as mudas foram transferidas para a aclimação a sombra, onde receberam duas adubações, sendo a primeira aos 47 dias com solução nutritiva (5 mL/tubete), composta por macronutrientes (0,5 kg de MAP (monoamônio fosfato), 0,7 kg de cloreto de potássio, 1,5 kg de cloreto de cálcio, 1,0 kg de sulfato de magnésio por litro) e micronutrientes (50 g de ferrilene, 1,5 g de sulfato de manganês, 3 g de ácido bórico, 0,25 g de sulfato de zinco, 0,20 g de sulfato de cobre e 0,04 g de molibdato de sódio por litro de solução) e a segunda realizada aos 53 dias com solução de Ouro Verde[®] à base de NPK (15:15:20) (5 mL/tubete).

A velocidade de enraizamento (emissão de raízes no fundo do tubete) foi determinada a cada três dias, do 18º ao 39º dia após o estaqueamento e o incremento calculado pela diferença entre o número de

tubete com raiz exposta de cada avaliações dividida pelo intervalo de tempo entre elas (3 dias). Aos 60 dias avaliou-se biomassa do sistema radicular e da parte aérea.

Para atestar a qualidade do inoculante e determinar concentração de bactérias por mL ou g utilizado no experimento, foi realizado a técnica de micro-gotas (24), para as duas formulações (item 2.2.) (Tabela 1).

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônias (u.f.c./mL ou g) dos isolados de rizobactérias veiculados nas formulações turfosa e líquida do lote de inoculante utilizado no experimento

Isolado	Espécie	Concentração (u.f.c./mL ou g)	
		Formulação	
		Líquida	Turfosa
3918	<i>Bacillus subtilis</i>	$4,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$
S1	<i>Bacillus subtilis</i>	$3,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
S2	<i>Bacillus subtilis</i>	$3,8 \times 10^9$	$6,4 \times 10^8$
R1	<i>Frateuria aurantia</i>	$6,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$
Ca	<i>Pseudomonas fulva</i>	$7,0 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$
FL2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$
MF2	<i>Pseudomonas</i> sp.	$8,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
MF4	<i>Pseudomonas</i> sp.	$7,2 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
Média		$3,2 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

No ensaio de viveiro, para a avaliação da eficiência dos inoculantes, adotou-se delineamento de blocos ao acaso, no esquema de parcelas subdivididas. A parcela foi constituída por formulação e a subparcela foi composta de 10 tratamentos, sendo oito isolados de rizobactérias, um tratamento com a aplicação do hormônio ácido indolbutírico (AIB) e uma testemunha sem inoculação. Empregaram-se 8 blocos, sendo o conjunto de 15 plantas considerada uma unidade experimental. Entre cada subparcela foi deixada uma fileira de orifícios sem tubetes, para minimizar o risco de contaminações pelas gotas d'água durante a irrigação, ou por escorrimento

lateral de água na superfície da bandeja. Os blocos foram dispostos ao longo da casa de enraizamento e separados por clone e formulação. Utilizaram-se dois clones (409 e 11) e duas formulações (turfa e solução estabilizante).

Os dados foram analisados com o auxílio do pacote estatístico SAS V.8 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Efetuuou-se análise de regressão linear dos valores de incremento de velocidade de enraizamento obtidos nas oito avaliações realizadas. Os dados ajustaram-se ao modelo monomolecular, em vista da independência de resíduos e pela correlação de Pearson, obtendo os valores de taxa de enraizamento (r_v). Para testar a hipótese de semelhança entre as taxas de enraizamento, determinada pelo incremento a cada três dias, calculou-se o intervalo de confiança (5) em relação à testemunha e ao hormônio AIB.

Para os valores de biomassa da parte aérea e do sistema radicular, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk, para a verificação da normalidade, e posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância, segundo o esquema de parcelas subdivididas e empregando-se o teste Tukey a 5% para comparação dos tratamentos. Os dados de peso seco da raiz (PSR), para os dois clones e as duas formulações foram transformados para $1/(PSR)$.

3. RESULTADOS

3.1. Viabilidade dos isolados de rizobactérias nas formulações líquida e turfosa

Na solução estabilizante observou-se maior viabilidade dos isolados, em média com 1×10^{10} u.f.c./mL, comparado aos isolados veiculados em turfa, com $6,5 \times 10^9$ u.f.c./g no período de 180 dias. Os isolados S1, S2 e MF2 foram mais estáveis ao longo do tempo nas duas formulações.

A viabilidade dos isolados S2, FL2 e Ca, veiculados em turfa canadense e em solução estabilizante, foi a mesma para ambas as formulações, durante o período de armazenamento. O FL2 destacou-se para as duas formulações dos demais isolados com concentração média de 3×10^{10} u.f.c./mL. A maior sobrevivência na formulação turfosa foi observada para o isolado MF2, com concentração bacteriana média de 1×10^{10} u.f.c./mL, e na formulação líquida destacaram-se os isolados S1, 3918, FL2 e MF4 contendo em torno de $1,5 \times 10^{10}$ u.f.c./mL ao longo do tempo.

Os isolados S1, 3918, MF2 e MF4, veiculados na formulação líquida, possuíram elevada população bacteriana na primeira avaliação e após 20 dias de armazenamento a concentração foi reduzida.

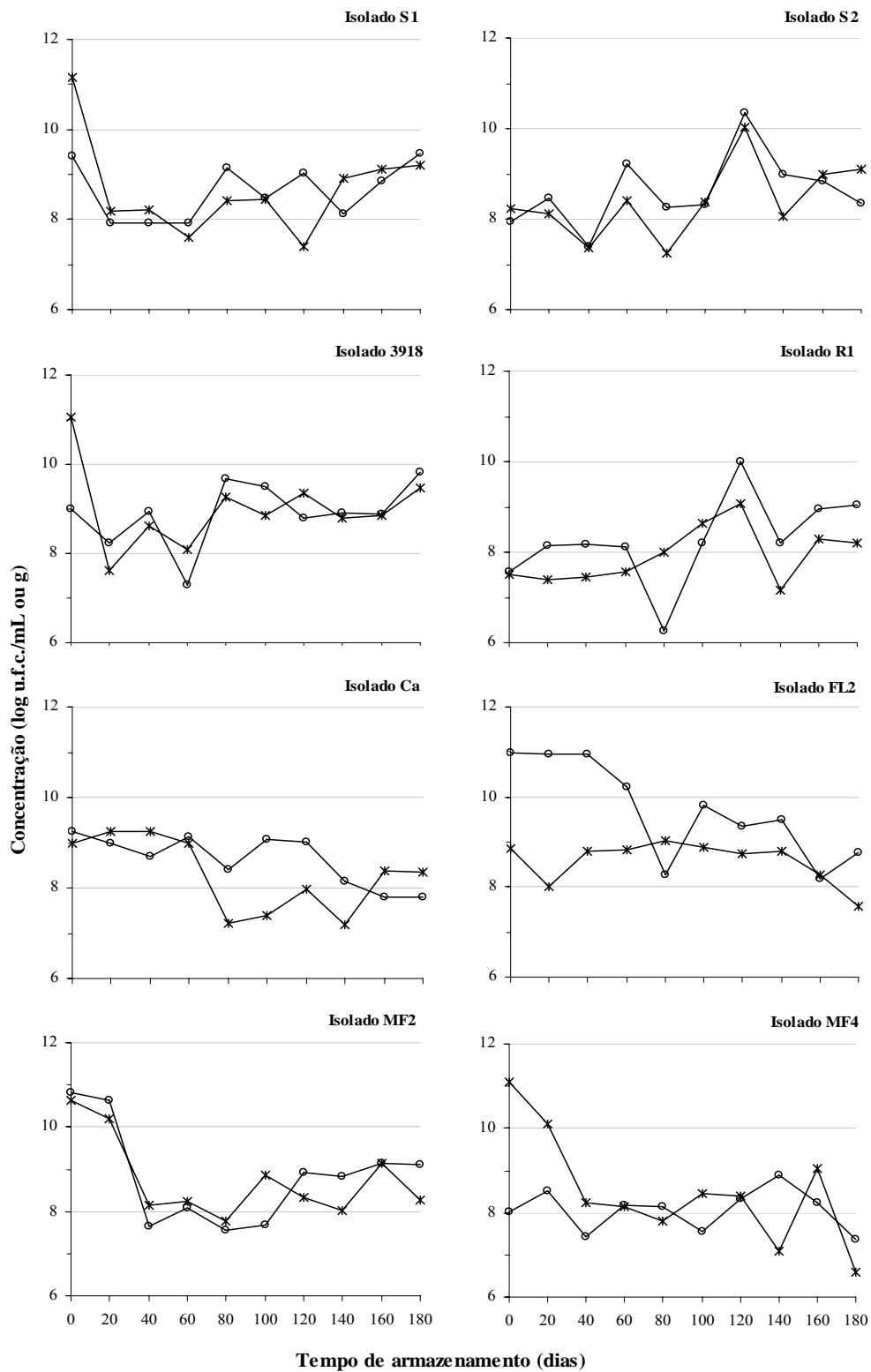


Figura 1. Viabilidade dos isolados S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 e MF4 veiculados nas formulações líquida (*) e turbosa (o), armazenados em temperatura ambiente por 180 dias.

3.2. Eficiência das formulações turfosa e líquida sobre o enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto

A eficiência dos isolados variaram de acordo com o tipo de formulação, clone utilizado e variável analisada.

Maior emissão de raízes (%) das miniestacas estaqueadas em substrato rizobacterizado foi observada para os dois clones.

Os isolados na formulação turfosa propiciaram maior emissão de raízes do clone 409, comparado á formulação líquida em relação a testemunha. Observou-se que todos os isolados veiculados na formulação turfosa atingiram 60% de enraizamento entre 27 e 33 dias após o estaqueamento, enquanto a testemunha somente atingiu esta porcentagem aos 36 dias, destacando-se o isolado FL2 que aos 36 dias alcançou 81% de emissão de raízes nos tubete (Figura 2). Na formulação líquida, destacaram-se os isolados S1, R1 e MF2 com maior porcentagem de emissão das raízes abaixo do tubete, em relação aos tratamentos testemunha e AIB. Para as duas formulações testadas, o tratamento com AIB aplicado na base das miniestacas obteve maior enraizamento até o 24º dia após o estaqueamento, depois deste período, o incremento de enraizamento tornou-se constante, enquanto que para os tratamentos com os isolados de rizobactéria observou-se aumento na emissão de raízes (Figura 3).

Para o clone 11, as formulações turfosa e líquida não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$), desta forma optou-se por apresentar a média das duas formulações por tratamento. Todos os isolados de rizobactérias testados resultaram em maior porcentagem de emissão de raízes do que a testemunha e o tratamento com AIB. Os isolados MF2, R1, S1 e S2 atingiram em média 85% da emissão de raízes, enquanto a testemunha alcançou 75% aos 39 dias após o estaqueamento (Figura 4).

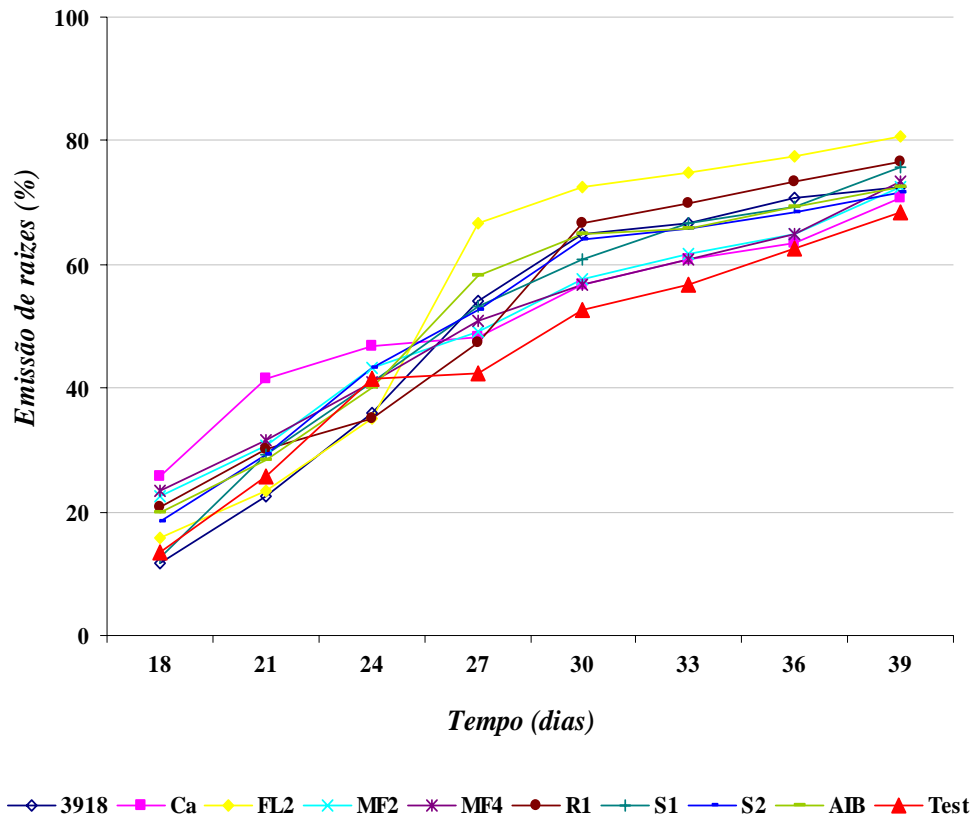


Figura 2. Desenvolvimento da emissão de raízes (%) do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados na formulação turfosa, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

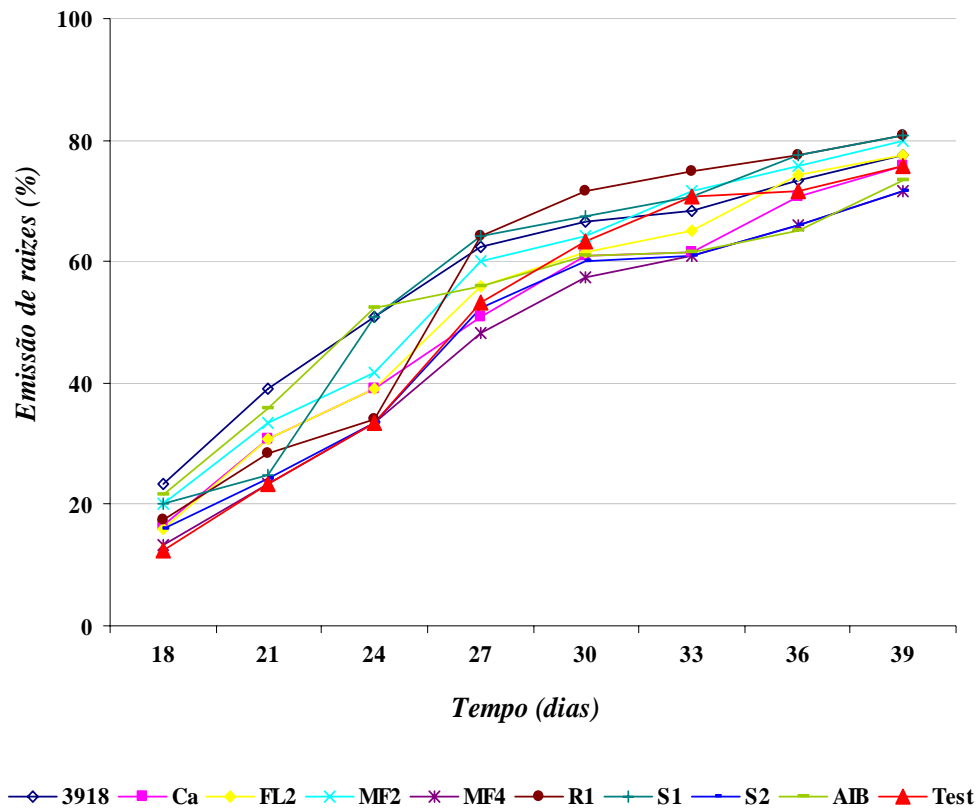


Figura 3. Desenvolvimento da emissão de raízes (%) do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados na formulação líquida, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

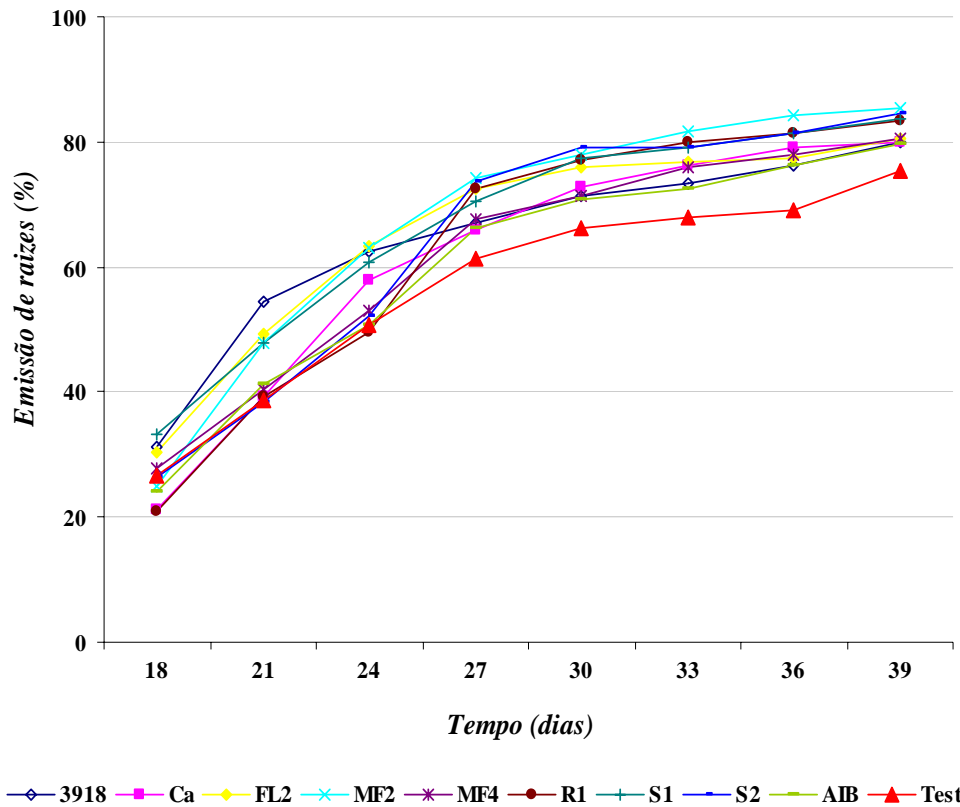


Figura 4. Desenvolvimento da emissão de raízes (%) do clone de *Eucalyptus grandis* (11), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados na formulação líquida e turfosa, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

Os maiores incrementos foram observados no período entre 18 a 27 dias do estaqueamento, e após este período até a última avaliação, os incrementos foram menores não diferindo dos resultados apresentados pelos isolados em relação à testemunha e o tratamento com AIB (Figuras 5, 6 e 7).

Para o incremento de enraizamento entre as avaliações sobre o intervalo de tempo foi observado efeito significativo ($P < 0,05$) entre as formulações turfosa e líquida do clone 409 (Figuras 5 e 6). Para os tratamentos na formulação turfosa observou-se maiores incrementos no intervalo entre as avaliações realizadas nos dias 21 a 30 após o estaqueamento e menores taxas nas últimas avaliações. O incremento obtido pelo tratamento do isolado FL2 foi o maior observado entre as avaliações realizadas nos dias 24 a 27 após o estaqueamento (Figura 5). Na formulação líquida, o incremento de enraizamento do clone 409 foi maior no intervalo entre as avaliações realizadas no 21º e 24º dias após o estaqueamento para os isolados S1 e R1, respectivamente (Figura 6).

As formulações turfosa e líquida, para o clone 11, não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$) em relação ao incremento calculado entre as avaliações sobre o tempo de avaliação, por isso optou-se por apresentar a média das duas formulações por tratamento. Os maiores incrementos foram observadas nas avaliações correspondentes aos 18º e 27º dias após o estaqueamento e os menores valores foram observados entre as três últimas avaliações realizadas. O isolado 3918 destacou-se na primeira avaliação com maior incremento. Nas avaliações realizadas no intervalo entre 24 e 27 dias após o estaqueamento o isolado R1 apresentou maior taxa de incremento de enraizamento (Figura 7).

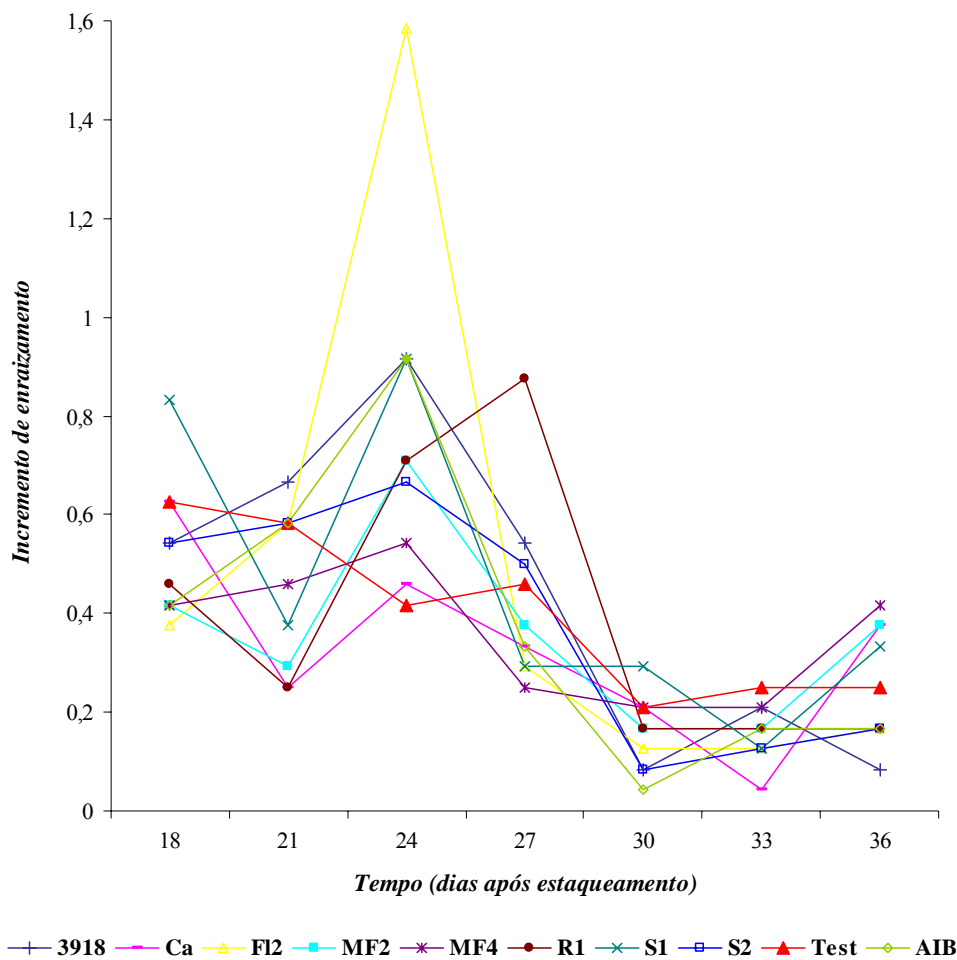


Figura 5. Incremento de enraizamento obtidos entre as avaliações sobre o intervalo de tempo (3 dias), nas oito avaliações realizadas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados na formulação turfosa, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

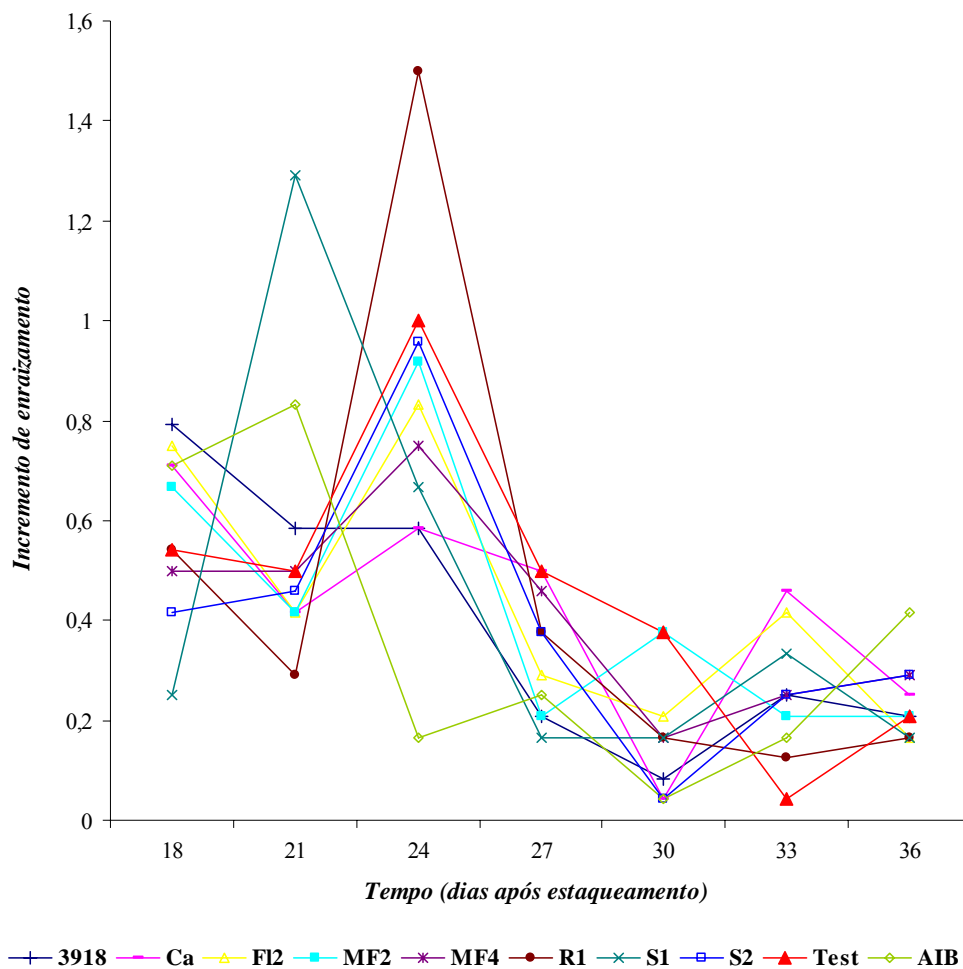


Figura 6. Incremento de enraizamento obtidos entre as avaliações sobre o intervalo de tempo (3 dias), nas oito avaliações realizadas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados na formulação líquida, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

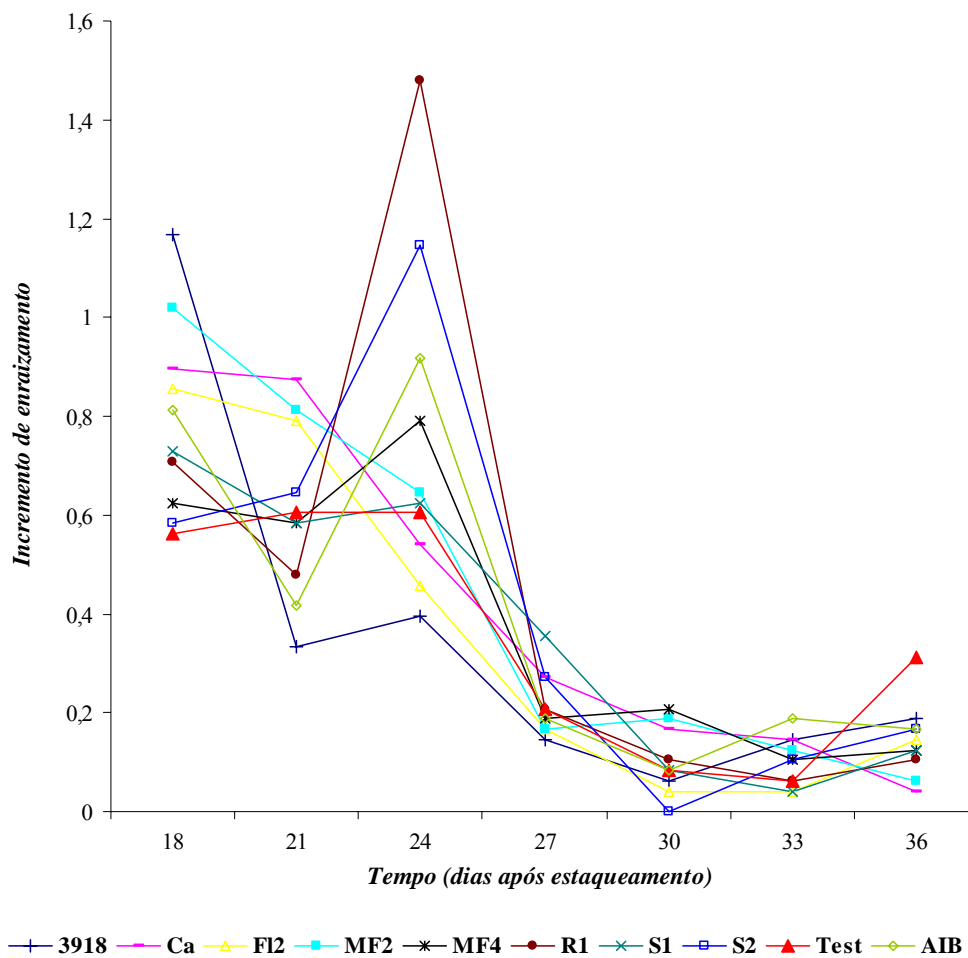


Figura 7. Incremento de enraizamento obtidos entre as avaliações sobre o intervalo de tempo (3 dias), nas oito avaliações realizadas do clone de *Eucalyptus grandis* (11), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados nas formulações líquida e turfosa, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) entre as formulações turfosa e líquida para o clone 409 em relação à taxa de enraizamento ao longo do tempo (r_v). Os tratamentos que induziram em plantas do clone 409 maior taxa de enraizamento, em relação à testemunha, foram os isolados 3918, FL2, MF2, R1, S1, S2 na formulação turfosa e o tratamento com AIB, assim como, os isolados MF2, R1 e S1 formulados em solução estabilizante. Em relação ao tratamento com AIB, os isolados 3918, FL2, R1 e S1 na formulação turfosa e todos os isolados na formulação líquida diferiram significativamente deste, isto é, o inoculante líquido propiciou maior velocidade de enraizamento que o AIB aplicado na base das miniestacas (Tabela 2).

A resposta à rizobacterização, variou de acordo com o clone, tipo de formulação e isolado testado, sendo o clone 11 o que melhor respondeu a aplicação dos inoculantes. Como não houve diferença entre as duas formulações, para o clone 11, empregou-se a média das duas formulações para comparação dos tratamentos. Todos os tratamentos diferiram da testemunha e em relação à aplicação com AIB, à exceção do isolado 3918 que foi estatisticamente similar ao tratamento hormonal (Tabela 3).

Tabela 2. Taxa de enraizamento (r_v) de mudas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (409) tratadas com isolados bacterianos e o intervalo de confiança da diferença entre as médias dos isolados e dos tratamentos testemunha (ICTest) e ácido indolbutírico (ICAIB), nas formulações líquida e turfosa

Tratamento	Formulação Líquida			Formulação Turfosa		
	r_v	ICTest	ICAIB	r_v	ICTest	ICAIB
3918	0,062	-0,006 ; 0,017	0,013 ; 0,018*	0,066	0,019 ; 0,014*	0,007 ; 0,013*
Ca	0,058	-0,010 ; 0,014	0,008 ; 0,015*	0,041	-0,006 ; 0,016	-0,017 ; 0,015
FL2	0,064	-0,004 ; 0,012	0,014 ; 0,013*	0,080	0,033 ; 0,019*	0,022 ; 0,019*
MF2	0,068	0,001 ; 0,015*	0,019 ; 0,016*	0,048	0,001 ; 0,016*	-0,011 ; 0,015
MF4	0,055	-0,013 ; 0,014	0,005 ; 0,015*	0,047	-0,001 ; 0,014	-0,012 ; 0,013
R1	0,078	0,011 ; 0,017*	0,029 ; 0,018*	0,062	0,015 ; 0,015*	0,003 ; 0,015*
S1	0,075	0,008 ; 0,014*	0,026 ; 0,015*	0,063	0,016 ; 0,015*	0,004 ; 0,014*
S2	0,055	-0,013 ; 0,014	0,005 ; 0,0015*	0,057	0,010 ; 0,014*	-0,002 ; 0,014
AIB	0,050	-	-	0,059	-	-
Testemunha	0,068	-	-	0,047	-	-

* Como o intervalo de confiança não inclui zero, há diferença significativa ($P= 0,05$) entre o isolado e o tratamento

Tabela 3. Taxa de enraizamento (r_v) de mudas do clone de *Eucalyptus grandis* (11) tratadas com isolados bacterianos e o intervalo de confiança da diferença entre as médias dos isolados e dos tratamentos testemunha (ICTest) e ácido indolbutírico (ICAIB), nas formulações líquida e turfosa

Tratamento	Média entre as formulações		
	r_v	ICTest	ICAIB
3918	0,062	0,006 ; 0,014*	-0,008 ; 0,017
Ca	0,080	0,025 ; 0,013*	0,010 ; 0,017*
FL2	0,075	0,020 ; 0,013*	0,005 ; 0,016*
MF2	0,098	0,042 ; 0,016*	0,028 ; 0,018*
MF4	0,072	0,016 ; 0,014*	0,002 ; 0,018*
R1	0,091	0,036 ; 0,015*	0,021 ; 0,018*
S1	0,078	0,023 ; 0,013*	0,008 ; 0,016*
S2	0,089	0,034 ; 0,013*	0,019 ; 0,016*
AIB	0,070	-	-
Testemunha	0,055	-	-

* Como o intervalo de confiança não inclui zero, há diferença significativa ($P = 0,05$) entre o isolado e o tratamento

Em relação, as variáveis biomassa da parte aérea e radicular do clone 409, foi observado efeito significativo ($P < 0,05$) entre as formulações líquida e turfosa. O isolado S2 obteve maiores médias para biomassa da parte aérea, diferindo estatisticamente do isolado Ca nas duas formulações testadas. Em relação ao tratamento com AIB, o isolado S2 apresentou incremento de 17 e 10%, para as formulações líquida e turfosa, respectivamente (Tabela 4). Para biomassa do sistema radicular não houve diferença significativa entre os tratamentos. Contudo, pode-se observar que os isolados S2 e R1, veiculados na formulação turfosa, resultaram em incrementos de 47 e 23%, respectivamente, apresentando maior resposta que os mesmos isolados veiculados em formulação líquida que obtiveram 19 e 4% de incremento, respectivamente, comparados à testemunha. Em relação ao tratamento com o hormônio AIB, os isolados S2 e R1, obtiveram incrementos de 20 e 6% para formulação líquida e 58 e 32% para a formulação turfosa (Tabela 4).

Para a biomassa radicular, do clone 11, as formulações turfosa e líquida diferiram significativamente entre si ($P < 0,01$), entretanto, não

observou-se diferença entre as formulações para a biomassa da parte aérea. Em relação à biomassa da parte aérea, o isolado S2 diferiu dos isolados Ca, FL2 e R1, da testemunha e do tratamento comparador AIB com ganho de 18% em relação aos dois últimos tratamentos. Observou-se para a biomassa radicular, que os isolados veiculados em turfa apresentaram maiores incrementos do que os veiculados em solução estabilizante. Os isolados S1, S2 e MF4, veiculados em turfa canadense, resultaram em maior desenvolvimento do sistema radicular com incrementos de 40, 19 e 19%, respectivamente, comparados com a testemunha. Para a formulação líquida, destacaram-se os isolados S2, R1 e 3918 com incrementos de 21, 14 e 11% quando comparado à testemunha e de 16, 10 e 7% em relação ao tratamento AIB. (Tabela 5).

Tabela 4. Biomassa da parte aérea e radicular do clone *E. grandis* x *E. urophylla* (409), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados nas formulações turfosa e líquida, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

Tratamentos	Parte Aérea				Radicular	
	Form. Líquida		Form. Turfosa		Form. Líquida	Form. Turfosa
3918	0,53	ab	0,57	ab	0,162	0,169
Ca	0,49	b	0,50	b	0,148	0,159
FL2	0,53	ab	0,55	ab	0,156	0,168
MF2	0,61	ab	0,54	ab	0,154	0,202
MF4	0,59	ab	0,53	ab	0,152	0,203
R1	0,66	a	0,52	ab	0,166	0,238
S1	0,59	ab	0,54	ab	0,164	0,184
S2	0,68	a	0,64	a	0,189	0,285
AIB	0,58	ab	0,58	ab	0,157	0,180
Test	0,65	a	0,56	ab	0,159	0,194

Tratamentos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 5. Biomassa da parte aérea e radicular do clone *E. grandis* (11), estaqueado em substrato rizobacterizado com os inoculantes (S1, S2, 3918, R1, Ca, FL2, MF2 ou MF4) veiculados nas formulações turfosa e líquida, em comparação com o substrato não tratado (Test) e a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base das miniestacas

Tratamentos	Parte Aérea		Radicular	
	Form. Líquida e Turfosa		Form. Líquida	Form. Turfosa
3918	0,68	ab	0,243	0,208
Ca	0,66	b	0,218	0,221
FL2	0,63	b	0,213	0,190
MF2	0,67	ab	0,238	0,227
MF4	0,71	ab	0,240	0,246
R1	0,65	b	0,249	0,189
S1	0,66	ab	0,236	0,289
S2	0,77	a	0,264	0,247
AIB	0,65	b	0,227	0,238
Test	0,65	b	0,219	0,207

Tratamentos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,01$).

4. DISCUSSÃO

Oito isolados de rizobactérias, veiculados em turfa canadense e solução estabilizante, foram avaliados quanto à viabilidade do inoculante armazenado ao longo tempo e seus efeitos sobre o enraizamento de miniestacas e o crescimento de mudas de eucalipto.

A veiculação das rizobactérias em um material que conserve as características dos isolados e mantenha a população bacteriana a níveis adequados ao longo do tempo é necessário para viabilizar o uso destes microrganismos comercialmente. A vermiculita, talco, alginato, caulinita, lignita, farelo de trigo, farelo de aveia, caldo bacteriano e principalmente a turfa tem sido estudados como veículos para os diferentes gêneros de rizobactérias. Em geral, as formulações em pó têm se mostrado eficientes no controle de doenças e na melhora da qualidade das plantas (1, 30), entretanto a formulação líquida oferece diferentes formas de aplicação, como por exemplo a aplicação do inoculante juntamente a solução nutritiva adicionada ao substrato, que pode facilitar a utilização do inoculante na produção de mudas de eucalipto. Observou-se viabilidade de todos os isolados de rizobactérias, tanto veiculados em turfa canadense, com concentração bacteriana média de $6,2 \times 10^9$ u.f.c./mL, quanto na formulação líquida com $9,5 \times 10^9$ u.f.c./mL, ao longo de 6 meses, armazenados à temperatura ambiente. Os isolados de *Bacillus subtilis*, provavelmente devido à capacidade de formar endósporos, demonstraram maior estabilidade da população ao longo do tempo de estocagem do produto.

A resposta a rizobacterização variou de acordo com o clone, isolado, formulação e variável analisada com o clone, tipo de formulação e isolado

testado, mas em geral obteve-se ganho em relação à testemunha (sem inoculação) e o tratamento comparador com AIB (ácido-indolbutílico). A variação nos resultados sugere uma aparente especificidade entre isolado de bactéria e clone de eucalipto e foi anteriormente observada nos ensaios de seleção seleção (28), na produtividade das minicepas de eucalipto (21), e nos ensaios utilizando misturas de isolados (20).

Através da determinação da concentração de cada isolado nas duas formulações utilizadas no experimento, pode-se atestar a pureza e uma população bacteriana viável que em média atingiu 3×10^9 u.f.c./mL ou g nos inoculantes turfoso e líquido. Estudos demonstram que a população bacteriana de isolados de rizobactérias veiculados em turfa com concentração inicial em torno de 10^8 a 10^9 u.f.c./mL se mantiveram estáveis após os primeiros dias de armazenamento (4, 7, 10), assim como demonstraram efeito positivo no controle de patógenos, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium udum*, *Pythium aphanidermatum* e *F. oxysporum* (1, 10, 28), e foram eficientes no aumento do enraizamento e na produção de culturas como ervilha e tomate (9, 29).

A velocidade de enraizamento foi determinada contando-se o número de miniestacas que emitiam raízes no fundo do tubete, entretanto este método por não ser destrutivo prejudica a avaliação de forma que as miniestacas em que as raízes ficam enoveladas ao longo do tubete e não se exteriorizam não são adicionadas às avaliações. Entretanto através desta variável pode-se determinar o desenvolvimento da emissão de raízes (%) ao longo do tempo, o incremento de enraizamento obtido entre as avaliações sobre o intervalo de tempo (3 dias), a taxa de enraizamento (rv) e o intervalo de confiança em relação à testemunha e o tratamento comparador AIB. Para estas variáveis calculadas a partir dos dados de velocidade de enraizamento, destacou-se o isolado FL2, na formulação turfosa e os isolados MF2, R1 e S1, na formulação líquida, para o clone 409, o que reflete no observado para os mesmos isolados e formulações em relação as maiores concentrações iniciais dos inoculantes utilizados. Para o clone 11 não houve diferença entre as formulações, observando a média entre os tratamentos os isolados com melhores resultados foram MF2 e R1.

Maior emissão de raízes das miniestacas estaqueadas em substrato rizobacterizado foi observada para os dois clones, sendo que os isolados na formulação turfosa propiciaram maior emissão de raízes do clone 409, comparado á formulação líquida em relação a testemunha. Com base nos dados analisados as miniestacas em substrato rizobacterizado apresentam maior capacidade de emissão de raízes e podem ser retiradas mais precocemente da casa de enraizamento, otimizando a utilização da estrutura por um período de até 6 dias. Além deste benefício estrutural, as miniestacas permanecendo menor tempo na casa de vegetação, também ficarão menos expostas às condições favoráveis ao ataque de patógenos, podendo assim reduzir as perdas por doenças bióticas.

O isolado S2, de *B. subtilis*, destacou-se dos demais tratamentos para as variáveis biomassa radicular e da parte aérea, nas formulações líquida e turfosa, destacando-se como uma rizobactéria de interesse comercial para a produção de mudas de eucalipto. Isolados de *Bacillus licheniformis* e *B. pumilus*, inoculados em plantas de *Pinus pinea* L., após 90 dias, aumentaram a biomassa da parte aérea das plantas e aos 150 dias da inoculação, observou-se aumento significativo na biomassa das plantas em relação a testemunha, entretanto os tratamentos de bactérias não diferiram entre si (22).

Para o clone 409 (*E. grandis* x *E. urophylla*) a biomassa radicular não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para as duas formulações utilizadas. Resultados similares foram observados por Mafia *et al.* (21) para o mesmo clone, cujo substrato foi tratado com suspensão bacteriana em solução salina dos mesmos isolados, de forma que se confirma a especificidade entre os isolados e clone de eucalipto, não havendo interferência do veículo, turfa ou solução estabilizante, para a variável analisada.

As rizobactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são atualmente as mais utilizadas comercialmente e apresentam melhores efeitos de promoção de crescimento e biocontrole. Substratos à base de turfa tem demonstrado maior estabilidade ao longo do tempo e praticidade em veicular rizobactérias comercialmente na produção de mudas com maior vigor e produtividade (9, 14, 15).

A inoculação de rizobactérias ao substrato de enraizamento tem acarretado melhoria na qualidade das mudas de eucalipto levadas ao campo, além de promover o controle de patógenos (16, 29). Com a utilização de um veículo, seja em solução estabilizante ou turfa canadense, o uso do inoculante tornou-se mais prático e viável e além de conservar a concentração bacteriana desejável por no mínimo 6 meses, mostrou-se eficiente no enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas de eucalipto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amer, G.A.; Utkhede, R.S. (2000). Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 809-816.
2. Benizri, E., Baudoin, E.; Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 11, 557-574.
3. Boer, M., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C.; Bakker, A.H.M. (1999). Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 201-210.
4. Brown, T.A. (2003). *Clonagem genica e análise de DNA: Uma introdução*, Porto Alegre, 376p.
5. Campbell, C.L.; Madden, L.V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*, New York, 532p.
6. Cattelan, A.J., Hartel, P.G.; Fuhrmann, J.J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63, 1670-1680.
7. Daigle, D.J., Connick, W.J.; Boyetchko, S.M. (2002). Formulating a weed-suppressive bacterium in "Pesta". *Weed Technology*, 16, 407-413.
8. Davison, J. (1988). Plant beneficial bacteria. *BioTechniques*, 6, 282-286.

9. Enebak, S.A., Wei, G.; Klopper, J.W. (1997). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Science*, 44, 139-144.
10. Freitas, J.R., Banerjee, M.R.; Germida, J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24, 358-364.
11. Gagné, S., Dehbi, L., Le Quéré, D., Cayer, F., Morin, J., Lemay, R.; Fournier, N. (1993). Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biology & Biochemistry*, 25, 269-272.
12. Kado, E.I.; Heskett, M.G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-976.
13. Klopper, J.W., Lifshitz, R.; Zablotowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7, 39-43.
14. Klopper, J.W.; Schroth, M.N. (1978) **IN** INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA (ANGERS, Ed.), Vol. 4, pp. 879-882, Angers.
15. Klopper, J.W., Schroth, M.N.; Miller, T.D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70, 1078-1082.
16. Kokalis-Burelle, N., Klopper, J.W.; Reddy, M.S. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31, 91-100.
17. Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Rosskopf, E.N.; Shelby, R.A. (2002). Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil*, 238, 257-266.
18. Ladeira, M.C.G. (2004) Controle biológico de *Quambalaria eucalypti* mediado por rizobactérias. Departamento de Fitopatologia, pp. 45, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

19. Liu, L., Kloepper, J.W.; Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85, 1064-1068.
20. Mafia, R.G. (2004) Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto. Departamento de Fitopatologia, pp. 118, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
21. Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., Zarpelon, T.G.; Siqueira, L. (2005). Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobacterias selecionadas. *Revista Árvore*, 29, 843-851.
22. Pan, B., Bai, Y.M., Leibovitch, S.; Smith, D.L. (1999). Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*, 11, 179-186.
23. Press, C.M., Loper, J.E.; Kloepper, J.W. (2001). Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Biological Control*, 91, 593-598.
24. Romeiro, R.S. (2001). *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Editora UFV, Viçosa, 279pp.
25. Shishido, M.; Chanway, C.P. (2000). Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. *Can J For Res*, 30, 845-854.
26. Silveira, E.B., Gomes, A.M.A., Mariano, R.L.R.; Silva Neto, E.B. (2004). Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. *Horticultura Brasileira*, 22, 217-221.
27. Teixeira, D.A. (2001) Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-*Cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp. Departamento de Fitopatologia, pp. 80, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

28. Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G., Ferreira, E.M., Siqueira, L., Maffia, L.A.; Mounteer, A.H. (2007). Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 1-6.
29. Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G., Maffia, L.A.; Ferreira, E.M. (2005). Evidências de Indução de Resistência Sistêmica à Ferrugem do Eucalipto Mediada por Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 350-356.
30. Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K.; Vasumathi, K. (1997). Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biological Control*, 8, 166-171.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

– As características morfológicas de coloração e elevação das colônias separaram todos isolados de rizobactérias; Os isolados de *Bacillus subtilis*, de *Pseudomonas* sp. e de *P. fulva* foram diferenciados por suas características morfológicas e pela sensibilidade a antibióticos;

– No antibiograma os isolados testados foram insensíveis à penicilina, exceto o isolado R1; Oxacilina inibiu somente o crescimento dos isolados de *B. subtilis*; O isolado FL2 foi o único insensível a cefepime e norfloxacin;

– Para a análise molecular utilizou-se a técnica PCR-RFLP da região 16S do DNA ribossomal e as enzimas *Sau3AI* e *MspI* separaram através da clivagem o maior número de isolados; Os perfis de restrição produzidos por nove enzimas de restrição permitiu a separação entre os isolados CIIb, R1 e FL2 e os grupos de *Bacillus* (S1, S2 e 3918) e de *Pseudomonas* (MF2, MF4 e Ca);

– Todos os isolados avaliados foram viáveis nas formulações turfosa e líquida armazenados em temperatura ambiente durante 180 dias;

– Os inoculantes em ambas as formulações foram eficientes na produção de mudas de eucalipto; Os isolados FL2, R1, MF2, S1 e S2 veiculados na formulação turfosa ou líquida destacaram-se por atingirem mais de 80% da emissão de raízes abaixo do tubete em menos tempo quando comparado aos tratamentos testemunha e AIB; Para biomassa da parte aérea e do sistema radicular o isolado S2, de *B. subtilis*, destacou-se dos demais tratamentos para os dois clones nas duas formulações testadas;