

JEANE DE FÁTIMA CUNHA

RIZOBACTERIZAÇÃO NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE SIBIPIRUNA
(Caesalpinia peltophoroides Benth)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

JEANE DE FÁTIMA CUNHA

RIZOBACTERIZAÇÃO NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE SIBIPIRUNA
(Caesalpinia peltophoroides Benth)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 21 de Junho de 2005

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Aloisio Xavier

Prof. Haroldo Nogueira de Paiva
(Conselheiro)

José Mauro Gomes
(Orientador)

A Deus,
Pelas suas misericórdias e por sua fidelidade;
Aos meus pais,
que me apoiaram durante todo o tempo;
Ao meu marido Isac Jonatas Brandão,
que foi, em todos os momentos, o meu companheiro e melhor amigo;
Aos meus irmãos em Cristo,
os quais colaboraram com orações e amizade.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus, por ser escudo e fortaleza e socorro presente na angústia.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Engenharia Florestal, que acreditou e investiu no meu trabalho.

Ao meu orientador, José Mauro Gomes, pelo incentivo e apoio.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, que exerceu papel ímpar em minha formação acadêmica e profissional, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas pela formulação dos isolados de rizobactérias.

Ao Aderlan, pela amizade e colaboração durante a minha vida acadêmica.

Ao Reginaldo, pelas sugestões e informações prestadas, que contribuíram imensamente para a realização do trabalho.

A minha família, em especial, aos meus pais, irmãos e a meu marido Isac Jonatas Brandão, pelo apoio, pela presença e pela ajuda em todos os momentos. A todos os amigos que, dentro ou fora do Departamento, me ajudaram, em especial, à Sueli, ao Márcio, à Maria Lúcia, Márcia, ao Gustavo, Rosalvo, Alex, Paulo, à Suzana, Roberta, Cornélia, Cláudia, Maísa, Taísa, Camila, Bethânia, Cristiane, Natália, Bárbara, Ive e ao Mateus.

Aos irmãos da Igreja em Viçosa, os quais sempre me sustentaram com orações e amizade, em muitos momentos difíceis.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia Florestal, Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta/Patógeno e do Viveiro de Pesquisa da UFV em especial, à Márcia, Ana, ao Sebastião, Renildo, João, à Rita, ao Magela, Frederico e à Jamile pela colaboração.

BIOGRAFIA

JEANE DE FÁTIMA CUNHA, filha de João Marcos da Cunha e Luzia Soares Cunha, nasceu em Montes Claros-MG, em 19 de maio de 1975.

Em maio de 2002, obteve o grau de Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Em março de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 21 de junho de 2005.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1- Mecanismos de promoção de crescimento.....	4
2.1.1- Mecanismos diretos de promoção de crescimento.....	4
2.1.1.1- Produção de fitohormônio.....	4
2.1.1.2- Aumento da disponibilidade de nutrientes na rizosfera.....	6
2.1.1.3- Síntese de ácido carboxílico aminociclopropano deaminase.....	7
2.1.2- Mecanismos indiretos de promoção de crescimento.....	7
2.1.2.1- Supressão de micorganismos deletérios e/ou patogênicos.....	8
2.1.2.2- Antibiose.....	8
2.1.2.3- Competição.....	10

	Página
2.1.2.4- Indução de resistência.....	11
2.1.2.5- Parasitismo.....	12
2.1.2.6- Produção de compostos voláteis tóxicos.....	12
2.1.2.6- Promoção de associações simbióticas.....	13
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1-Seleção de isolados.....	14
3.1.1- Isolados testados.....	15
3.1.2- Produção e preparo do inóculo.....	15
3.1.3- Rizobacterização.....	15
3.1.4- Variáveis avaliadas.....	16
3.1.5- Procedimentos estatísticos.....	16
3.2-- Testes de formulações	16
3.2.1- Isolados testados.....	16
3.2.2- Produção das formulações e do inóculo.....	16
3.2.3- Rizobacterização.....	17
3.2.4- Variáveis avaliadas.....	17
3.2.5- Procedimentos estatísticos.....	17
4- RESULTADOS.....	19
4.1- Seleção de isolados.....	19
4.2- Teste de formulações	22
5- DISCUSSÃO.....	30
6- RESUMO E CONCLUSÕES.....	35

	Página
7- BIBLIOGRAFIA.....	38
8- APÊNDICE.....	50

RESUMO

CUNHA, Jeane de Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2005.
Rizobacterização no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). Orientador: José Mauro Gomes. Conselheiros: Acelino Couto Alfenas e Haroldo Nogueira de Paiva.

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de rizobactérias promotoras de crescimento sobre a germinação de sementes e biomassa do sistema radicular e da parte aérea de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*). Utilizaram-se os isolados pré-selecionados para eucalipto. Foram realizados dois ensaios: um de seleção, utilizando-se isolados de rizobactérias em suspensão salina, e outro com os isolados selecionados em diferentes formulações (líquida e sólida) e em suspensão salina. O segundo ensaio foi repetido para confirmação dos resultados. No primeiro ensaio, testaram-se os isolados Ca, FL2, MF2, MF4, RC3, R1, 3918, S1, S2 e CIIB. Para tanto, amostras de substrato à base de vermiculita e casca de arroz carbonizada (1:1) foram tratados com 5 mL de uma suspensão de cada isolado ($OD_{540} = 0,2$ A)/ tubete de 55 cc de capacidade, correspondendo a cerca de 10 ufc/mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, cada uma constituída por 20 sementes. Aos 40 dias, avaliaram-se a porcentagem de germinação e a massa seca de raízes e da parte aérea. Verificou-se aumento significativo em matéria seca de raiz e da parte aérea para todos os isolados de rizobactérias testados, em relação à testemunha. Todos os isolados proporcionaram

aumento significativo na germinação, à exceção do 3918 e CIIB que não diferiram da testemunha. Entre os isolados testados, quatro destacaram-se como os mais promissores (FL2, MF4, MF2 e CIIB) e subsequentemente foram testados em duas formulações (líquida e sólida) e em suspensão salina. Para cada tubete contendo 55 cc de substrato aplicou-se 1 mL da formulação líquida, 1 g da sólida e 5 mL do inóculo em suspensão salina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 3) com um tratamento adicional (testemunha), empregou-se o mesmo número de repetições e de sementes do primeiro ensaio. O segundo ensaio foi avaliado aos 40 dias. Não se observou diferença significativa entre as formulações líquida, sólida e o inóculo em suspensão salina, mas todas diferiram significativamente da testemunha para altura, matéria seca do sistema radicular e da parte aérea. Os ganhos médios na matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz e altura da parte aérea foram de 57,9 %, 51,8 % e 17,1 %, respectivamente. Este ensaio foi repetido e sua avaliação foi reduzida aos 30 dias. Diferentemente do ensaio dois, observou-se diferença significativa entre as formulações líquida, sólida e em suspensão salina, sendo que a formulação líquida promoveu maiores ganhos em altura, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, comparando-se com o inóculo em suspensão salina para os isolados CIIB e MF2. Para o FL2, os maiores ganhos na matéria seca de raiz e da parte aérea foram promovidos quando veiculado na forma sólida. O isolado MF4 formulado líquido não diferiu estatisticamente do MF4 em suspensão salina para germinação, altura e matéria seca da parte aérea. Ao analisar o ganho médio dos isolados superiores à testemunha nas diferentes formulações e em suspensão salina observou-se que ao aplicar a formulação líquida obtiveram-se ganhos em germinação, altura, matéria seca da raiz e da parte aérea de 13,4 %, 35,5 %, 47,1 % e 23,9 %, respectivamente. Com a formulação sólida os ganhos em germinação, altura, matéria seca da raiz e da parte aérea foram de 16,3 %, 35,0 %, 46,5 % e 19,4 %, respectivamente. Já para o inóculo em suspensão salina os ganhos foram de 13,8 % para germinação, 30 % para altura, 32,3 % para matéria seca de raiz e 15,3 % para matéria seca da parte aérea. Os resultados obtidos mostram ganhos significativos na produção de mudas, sem nenhum ajuste no manejo ou na estrutura do viveiro. Além desse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física dos viveiros, ao se diminuir o tempo de formação das mudas, reduzindo-se o custo de produção.

ABSTRACT

CUNHA, Jeane de Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2005.
Rhizobacterização for the growth of seedlings of sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). Adviser: José Mauro Gomes. Committee Members: Acelino Couto Alfenas and Haroldo Nogueira de Paiva.

This work aimed to evaluate the potential of growth-promoting rhizobacteria for seed germination and biomass of the root system and aerial part of seedlings of sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*). Isolates pre-selected for eucalyptus were used. Two assays were carried out: A selection assay using rhizobacteria isolates in saline suspension and another with the isolates selected in different formulations (liquid and solid) and saline suspension. The second assay was repeated for confirmation of the results. In the first assay, the following isolates were tested: Ca, FL2, MF2, MF4, RC3, R1, 3918, S1, S2 and CIIB. Thus, samples of vermiculite-based substrate and carbonized rice hull (1:1) were treated with 5 mL of a suspension of each isolate ($OD_{540} = 0.2$ A)/ tubette of 55 cc capacity corresponding to around 10 ufc/mL. The experimental design was completely randomized (CRD) with five repetitions per treatment, each constituted by 20 seeds. At 40 days, germination percentage and dry mass of the roots and the aerial parts were evaluated. A significant increase was observed in dry matter of the root and aerial part for all the rhizobacteria isolates tested, compared to the control. All the isolates provided significant germination increase, except 3918 and CIB, which did not differ from the control. Among the tested isolates, four were the most promising (FL2, MF4, MF2 and CIIB) and were subsequently tested in two formulations (liquid and solid) and in saline suspension. For each tubette

containing 55 cc of substrate, 1 mL of the liquid formulation, 1 g of the solid formulation, and 5 mL of the inoculum were applied in the saline suspension. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme (4 x 3) with an additional treatment (control), using the same number of repetitions and seeds of the first assay. The second assay was evaluated at 40 days. No significant difference was found between the liquid, solid formulations and the inoculum in saline suspension, but all differed significantly from the control in height, and root dry matter and aerial part height. The mean gains in dry matter of the aerial part, root dry matter and aerial part height were 57.9%, 51.8% and 17.1%, respectively. This assay was repeated and its evaluation was reduced to 30 days. Differently from assay 2, a significant difference between the liquid/ solid formulations and the saline suspension was observed, with the liquid formulation promoting higher gains in height, dry matter of the aerial part and root system, compared to the inoculum in saline suspension, for the isolates CIIB and MF2. For FL2, the highest gains in dry matter of the root and aerial part were promoted via solid form. The isolate MF4, formulated liquid, did not differ statistically from the MF4 in saline suspension for germination, height and dry matter of the aerial part. When analyzing the mean gain of the isolates superior to the control in the different formulations and saline suspension, it was observed that when the liquid formulation was applied, gains were obtained in germination, height, and dry matter of the root and aerial part of 13.4%, 35.5%, 47.1% and 23.9 %, respectively. For the solid formulation, the gains in germination, height, dry matter of the root and aerial part were 16.3%, 35.0, 46.5, and 19.4 %, respectively, while for the inoculum in saline suspension the gains were 13.8% for germination, 30% for height, 32.3% for root dry matter, and 15.3% for aerial part dry matter. The results obtained show significant gains in seedling production, without any adjustment in nursery management or structure. In addition to this direct gain, it is possible to make a better use of the physical structure of the nurseries by reducing the time needed for seedling formation, reducing the production costs.

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, tem sido grande a preocupação com a conservação de espécies florestais nativas, sendo que o seu uso vem sendo restringido e também protegido por lei no intuito de impedir a destruição das florestas brasileiras. Não é, pois, por falta de legislação que a natureza no Brasil vem sofrendo agressões (Câmara, 1982).

Poucos estudos existem a respeito de produção de mudas de espécies nativas, ao contrário da cultura do eucalipto que vem tomando espaço no Brasil devido ao desenvolvimento de pesquisas (Rocha, 2002).

Mudas de espécies nativas têm sido utilizadas para reflorestamentos ou recomposição florística e para arborização (Paiva e Gomes, 2000). Os reflorestamentos destinam-se à recomposição de matas ciliares ou recuperação de áreas degradadas. O aumento da demanda por este tipo de reflorestamento é devido a multas aplicadas por agências de fiscalização florestal sobre derrubadas ilegais, compensações ambientais por aberturas de estradas, minerações, empresas em busca de certificação ambiental, como a ISO 14000, ou proprietários rurais que procuram restaurar as florestas que existiam originalmente, para fins conservacionistas. Nesses casos são feitos plantios mistos com espécies nativas optando por aquelas que ocorriam ou ocorrem no local (Schettino e Gonçalves, 2002).

A utilização de espécies nativas para reflorestamento ou recomposição florística de áreas desmatadas é de grande importância para reduzir o impacto ambiental causado pelos desmatamentos e conservar a biodiversidade (Mendonça, 1998).

Um dos principais elementos que condicionam as boas condições do meio ambiente das cidades é representado pelas árvores, através de uma arborização variada e intensiva contribuindo para a elevação da qualidade de vida urbana, compondo as áreas de lazer, suavizando o excesso de sol e, por fim, tornando agradável a paisagem através de sua forma, folhagem e flores (Paiva e Gonçalves, 2002). Entre as espécies ornamentais destinadas à arborização urbana pode-se citar: pata de vaca, sibipiruna, ipê amarelo anão, flamboyant anão, resedê e murta (Lorenzi, 1992).

A sibipiruna é originária da Mata-Atlântica Brasileira. É uma árvore de grande porte (8 a 16 m de altura), apresenta folhas compostas bipinadas, produz flores amarelas em grande quantidade, floresce do final do mês de agosto a meados de novembro, seus frutos amadurecem no final de julho a meados de setembro e pertence à família das leguminosae-caesalpinoideae. A sibipiruna é encontrada em todas as regiões do Brasil, mas existe com mais intensidade no litoral entre Bahia e Rio de Janeiro. A sibipiruna, além de ser recomendada para o paisagismo urbano, no geral (por possuir bela aparência e raiz longitudinal), pode ser cultivada em parques e jardins, pois possui copa aberta e com muitos ramos, sendo indicada para recuperação de áreas degradadas como espécie secundária inicial ou pioneira; sua madeira pode, também, ser usada para construção civil, como caibros e ripas, para estrutura de móveis e caixotaria em geral (Lorenzi, 1992).

Para o sucesso desejado na implantação de projetos de reflorestamento, bem como arborização, é importante que as mudas sejam bem formadas, com maior resistência a doenças bióticas e abióticas, possibilitando melhor desempenho em condições de campo. Sendo assim, técnicas alternativas que otimizem a germinação das sementes e o crescimento de espécies nativas são fundamentais para melhorar a qualidade das mudas e reduzir o custo de produção. Neste aspecto as rizobactérias ganham destaque, pois podem propiciar a produção de mudas melhores.

Rizobactérias são bactérias da rizosfera com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo (Schroth e Hancock, 1982). A interação entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (Schippers et al., 1987). Rizobactérias benéficas são encontradas na rizosfera de diversas culturas e 2 a 5% dos isolados dessas rizobactérias podem apresentar um efeito positivo no crescimento de plantas (Schroth e Hancock, 1981). Aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção do crescimento e/ou proteção contra organismos patogênicos são chamadas de rizobactérias promotoras de

crescimento de plantas ou PGPR (Plant Growth-Promoting Rizobacteria) (Kloepper et al., 1990; Luz, 1996). As rizobactérias que são prejudiciais às plantas, chamadas DRMO (Deleterious Rhizosphere Microorganisms) colonizam as raízes e são consideradas patogênicas (Suslow e Schroth, 1982).

Dentre as PGPR, destacam-se as dos gêneros *Pseudomonas*, principalmente do grupo fluorescente, *Bacillus* e actinomicetos do gênero *Streptomyces*; embora outros gêneros de bactérias sejam citados na literatura (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* etc.) (Digat et al., 1993; Mahafee e Kloepper, 1994; Luz, 1996).

Rizobactérias tem sido estudadas há vários anos devido à capacidade de aumentar o crescimento de plantas (Brown, 1974; Lifshitz et al. 1987; Glick, 1995). Em essências florestais, observou-se o efeito de rizobactérias no crescimento de mudas oriundas de sementes de gimnospermas tais como *Pinus*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga* (Chanway, 1997; Eneback et al, 1998), pinheiro (Chanway, 1992) e abeto vermelho (Chanway e Holl, 1993). Em *Eucalyptus camaldulensis* foi observado um incremento de 44 % na sua biomassa após co-inoculação com *Azobacter chroococcum* e *Bacillus megaterium* (Mohammad e Prasad, 1988).

Dentre 107 isolados de bactérias obtidas da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, dez (Ca, FL2, MF2, MF4, RC3, R1, 3918, S1, S2 e CIIB) apresentaram potencial como promotores de enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp., proporcionando ganhos de 110% no enraizamento e de até 250 % no peso de matéria seca de raízes de estacas e miniestacas, sendo que os isolados FL2 e MF2 induziram resistência sistêmica à ferrugem causada por *Puccinia psidii* (Teixeira, 2001). Apesar dos resultados positivos obtidos no referido trabalho, poucos estudos têm sido realizados testando o efeito de rizobactérias em espécies nativas.

Devido aos resultados obtidos para *Eucalyptus* spp. aliado às necessidades de novas tecnologias para produção de mudas de espécies nativas, objetivou-se avaliar o potencial de isolados de rizobactérias na germinação de sementes e no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Mecanismos de promoção de crescimento

As PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) podem promover o crescimento de plantas por meio de mecanismos que atuam direta ou indiretamente.

2.1.1- Mecanismos diretos de promoção de crescimento

Os mecanismos diretos ocorrem quando as bactérias facilitam a incorporação de certos nutrientes ao ambiente ou devido à ação de compostos sintetizados por elas (Sikora, 1988). Os efeitos diretos no crescimento de plantas provavelmente decorrem da produção de fitohormônios como auxinas e giberelinas, inibição da síntese de etileno e disponibilidade de nutrientes através da mineralização de compostos orgânicos e através da solubilização de nutrientes (Mahafee & Kloepper, 1994).

2.1.1.1- Produção de fitohormônios

Muitos dos microrganismos que interagem com plantas possuem a capacidade de sintetizar hormônios semelhantes aos produzidos por elas para regulação de crescimento. Muitas rizobactérias são capazes de sintetizar alguns fitohormônios e seus análogos, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (Melo, 1998). O hormônio auxina é importante nos processos de iniciação de raízes laterais e adventícias e na alongação

radicular (Gaspar *et al.*, 1996 e Yang *et al.*, 1993). Após o tratamento da planta com algumas rizobactérias promotoras de crescimento, podem ocorrer dois efeitos relacionados à auxina, o primeiro devido à produção do microrganismo na rizosfera e o outro devido ao estímulo à síntese do hormônio pela própria planta (Gaudin *et al.*, 1994).

O ácido indol-acético (AIA) é a auxina mais comumente produzida na natureza, que é sintetizada principalmente em rotas bioquímicas dependentes do triptofano. A maioria das espécies presentes no solo são capazes de produzir AIA, podendo essa ser uma estratégia para detoxificação do excesso de triptofano, aminoácido que pode ser deletério às células bacterianas, liberado pelas raízes na rizosfera.. O AIA pode ainda estar envolvido na regulação da produção de outros compostos importantes no desenvolvimento bacteriano (Katsy, 1997). Isolados promotores de crescimento de plantas favorecem indiretamente seu próprio desenvolvimento, visto que dependem dos metabólitos liberados por seus hospedeiros na rizosfera, aumentando a quantidade de produtos exsudatos e a área de exsudação (Glick *et al.*, 1999).

Um mutante de *Pseudomonas fluorescens* super produtor de AIA estimulou o desenvolvimento radicular de groselheira-preta e inibiu as de cerejeira, o que indica que o efeito do AIA depende da quantidade produzida pela bactéria e do nível endógeno desse hormônio já existente na planta tratada, podendo variar entre genótipos e com a idade dos mesmos (Dubeikovsky, *et al.*, 1993). A maior produção de ácido AIA por um mutante de *Pseudomonas fluorescens* foi responsável por maior sobrevivência e maior peso fresco de raízes de plântulas de pepino em solo natural. Em solo autoclavado as plantas inoculadas com o mutante apresentaram menor desenvolvimento expresso pela menor alongação e peso fresco das raízes, além de menor peso fresco da parte aérea (Beyeler *et al.*, 1999). O efeito deletério da bactéria em solo autoclavado foi atribuído ao maior número de UFC no solo autoclavado, 60 vezes maior, e conseqüentemente a disponibilização de AIA em excesso para as plântulas de pepino.

A produção de hormônios por PGPR pode ser influenciada por vários fatores, sendo que os exsudatos radiculares possuem efeitos significativos na sua produção. Tal efeito pode ser devido à presença de precursores dos hormônios, como triptofano, nos exsudatos. A presença de exsudatos de milho estimula a produção de auxinas por *Pseudomonas fluorescens*, o que pode ser pela presença de triptofano nos exsudatos ou devido à liberação de triptofano oriundo de células mortas juntamente com os exsudatos (Benizri *et al.*, 1998). Diferentes exsudatos radiculares podem influenciar a mobilização

da matéria orgânica e a ação de giberilinas, auxinas e compostos relacionados (Nardi et al., 2002). A presença de triptofano também influenciaram a produção de auxinas e outras substâncias fenólicas por *Paenibacillus polymyxa* (Lebuhn et al., 1997). A produção de citocinina por *Paenibacillus polymyxa* ocorre na fase estacionária do crescimento (Timmusk et al., 1999). Em *Pseudomonas putida* a produção de ácido 3-indol acético provavelmente ocorre devido a conversão do ácido 3-indol pirúvico pela enzima dioxigenase do naftaleno (Mordukhova et al., 2000).

2.1.1.2- Aumento da disponibilidade de nutrientes na rizosfera

Muitas bactérias associadas com plantas não leguminosas têm a capacidade de fixar nitrogênio no solo e contribuir para um aumento na disponibilidade desse elemento para as plantas. No entanto grande parte das rizobactérias diazotróficas não simbiotes produz uma quantidade muito pequena de nitrogênio, quantidade essa quase toda utilizada para o seu próprio crescimento (Glick, 1995).

Bactérias produtoras de sideróforos podem ter um efeito positivo na absorção de ferro pelas plantas, pois algumas espécies de plantas são capazes de utilizar o complexo Fe-sideróforo no solo (Leong, 1986). Porém, embora a produção de sideróforos possa ajudar na absorção de ferro pela planta, na maioria dos casos esse efeito é muito pequeno (Glick, 1995).

O fósforo é um dos principais elementos que pode ter sua absorção aumentada com a utilização de rizobactérias. Esse efeito é devido à capacidade que alguns isolados promotores de crescimento têm de solubilizarem esse elemento via produção de enzimas e ácidos orgânicos e também em decorrência da maior parte de solo explorada pelo sistema radicular melhor desenvolvido. Isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas* aumentaram a absorção de fósforo em várias culturas (Datta et al., 1982; Lifshitz et al., 1987). Associado ao aumento da disponibilidade de fosfato para as plantas pelas PGPR's pode-se observar o aumento da produtividade de grãos de soja (Gaind & Gaur, 2002). Isolados solubilizadores de fosfatos naturais são encontrados também em solos de plantio de eucalipto (Silva Filho et al., 2002). A solubilização de fósforo depende da forma em que se encontra, da fonte de carbono presente, do microrganismo envolvido no processo e de outros elementos minerais presentes no solo como nitrogênio. Isolados de *Pseudomonas* apresentaram maior potencial de solubilização de fosfatos que isolados de *Bacillus*, que por sua vez foram melhores isolados do fungo

Aspergillus. Nenhum dos microrganismos foi capaz de solubilizar fosfato de ferro. A solubilização de fósforo a partir de fosfato de cálcio foi maior em relação à fosfato de alumínio para a grande maioria dos microrganismos testados (Silva Filho & Vidor, 2000). A presença de nitrato em meio de cultura pode reduzir ou inibir a atividade solubilizadora de diferentes microrganismos, sendo que a presença de amônio, na maioria dos casos favorece a solubilização dos fosfatos (Silva Filho & Vidor, 2001).

2.1.1.3- Síntese de ácido carboxílico aminociclopropano deaminase: inibição de etileno

Um dos mecanismos mais importantes envolvidos na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias é a capacidade que tais organismos têm de diminuir o nível endógeno de etileno nas mesmas (Hall *et al.*, 1996). O etileno pode atuar como indutor de enraizamento em várias espécies de plantas, porém, seu acúmulo apresenta efeito inibitório na posterior elongação das raízes formadas. Esse hormônio tem como precursor o ácido carboxílico aminociclopropano (ACC), que é derivado do AIA. Num modelo proposto por Glick *et al.* (1998), para explicar como rizobactérias capazes de utilizar o ACC podem atuar no crescimento radicular, os isolados promotores de crescimento seriam atraídos para a superfície do sistema radicular em resposta à secreção de triptofano e outros metabólicos liberados na região, utilizando esse aminoácido para sintetizar AIA que contribuiria para o aumento do nível endógeno desse hormônio na planta e estimulando os processos de proliferação e elongação celular. Uma parte desse AIA poderia estimular a atividade da enzima ACC sintase, convertendo adenosilmetionina (AdoMet) em ACC. Uma quantidade significativa desse ACC poderia ser liberado na rizosfera e hidrolizado por bactérias que produzem a enzima ACC deaminase liberando amônia e α -cetobutarato para seu metabolismo. Essa utilização do ACC pelas bactérias decresce a quantidade desse composto na planta o que pode levar a mesma a aumentar a exsudação do mesmo, visando manter um equilíbrio entre os níveis interno e externo de ACC. Como ACC é precursor do etileno, a sua hidrólise leva a uma diminuição desse hormônio na planta, o que propicia uma maior elongação do sistema radicular.

2.1.2- Mecanismos indiretos de promoção de crescimento

No caso de promoção indireta de crescimento, as rizobactérias atuam como agentes de biocontrole, beneficiando organismos benéficos às plantas ou suprimindo organismos deletérios ou patogênicos à estas.

As rizobactérias utilizam vários mecanismos para sobreviver na rizosfera e suprimir o ataque de patógenos às plantas, podendo ocorrer mais de um mecanismo ao mesmo tempo (Melo, 1998). Além da vantagem de serem encontradas em grande quantidade no solo, as rizobactérias são cultivadas em meio de cultura, facilitando o uso de formulações comerciais (Weller, 1988).

2.1.2.1- Supressão de microrganismos deletérios e/ou patogênicos

Muitas vezes, o efeito negativo de um microrganismo sobre a planta ocorre de uma forma dificilmente perceptível, não ocorrendo infecção ou aparecimento de sintomas típicos como os induzidos por organismos. Geralmente esses organismos afetam a planta por meio da produção de metabólitos tóxicos e seus efeitos se restringem à diminuição do desenvolvimento, em função de atuarem negativamente sobre os processos de germinação, brotação e enraizamento (Schippers et al., 1987), sendo os sintomas foliares semelhantes aos decorrentes de deficiências nutricionais. Muitos dos metabólitos que podem atuar no processo de promoção de crescimento também podem apresentar efeitos deletérios. A atuação positiva ou negativa de auxinas, etileno, citocininas e vitaminas e outras substâncias relacionadas ao crescimento de plantas produzidas na rizosfera vai depender de suas concentrações total e relativa.

A atuação de PGPR como agentes de biocontrole favorece indiretamente o desenvolvimento da planta hospedeira. Os principais mecanismos envolvidos nesse controle são competição, antibiose, parasitismos, produção de compostos voláteis tóxicos e indução de resistência.

2.1.2.2- Antibiose

Os antibióticos são compostos orgânicos que possuem baixo peso molecular e grande diversidade química produzidos por microrganismos e que, em baixas concentrações, atuam como deletérios ao metabolismo de outros organismos (Fravel, 1988). Outros produtos do metabolismo microbiano como agentes líticos, enzimas, compostos voláteis, metabólitos microbianos específicos e não –específicos assim como

diversos outros compostos tóxicos podem ter efeito deletério sobre os microrganismos da rizosfera (Sturz & Christie, 2003).

Devido sua facilidade de estudo *in vitro* o mecanismo de antibiose era o mecanismo mais estudado. Porém, a determinação do papel real de substâncias anti-microbianas *in situ* se mostra bem mais complexo, sendo sua atuação desuniforme no tempo e no espaço e ocorrendo somente em habitats onde os fatores ambientais favoreçam a ativação e expressão dos genes envolvidos em sua síntese (Loper *et al.*, 1997).

A capacidade de produzir antibióticos pode propiciar uma maior capacidade competitiva a isolados promotores de crescimento na rizosfera, aumentando sua sobrevivência e colonização no sistema radicular. Muitos antibióticos produzidos por bactérias são bem conhecidos, como oomicinas, fenazinas, pioluterinas e pirrolnitrinas. A promoção do crescimento vegetal e aumento na produção pode em certos casos ser correlacionada com a produção de substâncias anti-microbianas que apresentam efeito deletério contra patógenos e outras populações microbianas da rizosfera (Kloepper & Schroth, 1981).

Isolados *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Flavobacterium* apresentaram efeito antagonista contra *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* tanto *in vitro*, como da inoculação das rizobactérias em sementes de citros. O efeito antagônico das rizobactérias foi atribuído à produção de sideróforos e de substâncias tóxicas não identificadas (Amorin & Melo, 2002). Várias substâncias oriundas do metabolismo e co-metabolismo microbiano podem agir no controle e supressão de fitopatógenos. A supressão de *R. solani* por *Bacillus amyloliquefaciens*, agente de biocontrole utilizado contra vários patógenos fúngicos, foi atribuída à capacidade do isolado bacteriano produzir, em meio de cultura, três compostos isoméricos da iturina A, antibiótico cíclico lipopeptídico produzido por *B. subtilis* (Yu *et al.*, 2002). A antibiose de rizobactérias contra vários patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Getha e Vikineswary, 2002), *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Landa *et al.*, 2001), *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* e *Macrophomina phaseolina* (Pal *et al.*, 2001), *Botrytis cinerea* (Helbig & Bochow, 2001), *R. solani* (Pal *et al.*, 2000; Thrane *et al.*, 2001), *Sclerotinia minor* (El-Tarabily *et al.*, 2000), *F. graminearum* (Dal Bello *et al.*, 2002), *Pythium* (Naseby *et al.*, 2001), *Verticillium dahliae* (Berg *et al.*, 2001) entre outros já foi demonstrada em diversos hospedeiros.

Em vários casos estudados a produção de antibióticos por isolados de *Pseudomonas* sp. é codificada por um pequeno número de genes agrupados (Hammer *et al.*, 1997), mas a capacidade de controlar um patógeno específico não implica em proximidade genética dos isolados. Dentre 29 isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente com atividade antifúngica, foi verificada grande diversidade genética entre os isolados capazes de inibir *Pythium ultimum*, embora sete isolados que apresentaram maior controle de doença tenham apresentado similaridade maior que 68%. No mesmo grupo também estavam dois isolados sem capacidade de controlar o patógeno (Ellis *et al.*, 2000), mostrando que apenas a similaridade genética não implica em características desejáveis ao biocontrole. Existem também regulações mais complexas envolvendo um grande número de genes, como em *Streptomyces* spp. (Hutchinson e Fujii, 1995).

2.1.2.3- Competição

A competição entre organismos que convivem em um mesmo habitat, no caso da rizosfera, é principalmente por nutrientes e espaço. Essa competição pode levar até a exclusão de um organismo de um determinado nicho. O nitrogênio, o carbono e o ferro são elementos essenciais para o desenvolvimento da maioria dos fitopatógenos (Paulitz & Baker, 1987). A competição por ferro pelas PGPR envolvem a participação de compostos especiais denominados sideróforos, que são pequenos quelantes de Fe^{3+} de baixo peso molecular (500 – 1000 daltons), que são produzidos extracelularmente por vários microrganismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, em resposta ao estresse causado pela baixa concentração de ferro no ambiente de crescimento (Leong, 1986).

As espécies pertencentes ao grupo das *Pseudomonas fluorescens* produzem sideróforos como a pioverdina, que o nome comum é pseudobactina, que apresenta alta afinidade com o Fe^{++} e transporta esse elemento para o interior das células. Assim, os microrganismos fixam Fe^{++} , tornando-o menos disponível a outros incapazes de produzir agentes similares de transporte de ferro (Luz, 1996). Porém se o Fe^{++} não é limitante no solo, a presença de sideróforo não tem nenhum efeito (Luz, 1993).

Ocorreu competição por nutrientes entre oosporos do fungo *Pythium aphanidermatum*, causador da doença denominada de tombamento, e PGPR's. Essa competição promoveu o controle da doença (Elad & Chet, 1987). Outro exemplo de competição pôde ser observado no sistema *Erwinia cloacae* e *Pythium ultimum* onde

houve inativação do estímulo à germinação de esporângios do fungo, pois *P. ultimum* requer substâncias exudadas das sementes e na presença da bactéria essas moléculas são inativadas (Nelson, 1992).

2.1.2.4- Indução de resistência

Os mecanismos de defesa nas plantas podem ser ativados por um estímulo apropriado. Essa indução de resistência ocorre de forma natural, em especial quando são observadas reações de hipersensibilidade, e pode ser ativada por produtos químicos, organismos não patogênicos, formas avirulentas ou raças incompatíveis de uma patógeno ou por patógenos virulentos (Van Loon *et al.*, 1998). Em geral essa indução de resistência é sistêmica e seu efeito pode ser observado em locais da planta distantes do local de aplicação do indutor, embora, às vezes, ocorra apenas de forma localizada. Esse mecanismo é denominado de resistência sistêmica adquirida (SAR), caracterizada pelo acúmulo de ácido salicílico (AS) e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (Van Loon *et al.*, 1998).

A indução de resistência promovida por PGPR atua contra doenças causadas por fungos, bactérias, vírus (Liu *et al.*, 1995 a,b; Mauhofer *et al.*, 1998), insetos (Zehnder *et al.*, 1997) e nematoídes (Sikora, 1988). As principais PGPR envolvidas com o mecanismo de resistência induzida são: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., incluindo as espécies *P. fluorescens* e *P. putida* e *Serratia marcescens* (Luz, 1996).

A indução de resistência sistêmica provocada por *Pseudomonas putida* strain 89B-27 e *Serratia marcescens* strain 90-166 reduziu a fusariose em cucurbitáceas incitada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Liu *et al.*, 1995a). O tratamento de sementes de tomate com PGPR's reduziu a incidência e a severidade do Tomato mottle virus e aumentou a produção de frutos (Murphy *et al.*, 2000). O tratamento de sementes de cucurbitáceas com *P. putida* strain 89B-27, *Flavomonas oryzae* strain INR-5, *S. marcescens* strain 90-166 e *Bacillus pumilus* strain INR-7 promoveu a proteção sistêmica contra a mancha angular causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* reduzindo o diâmetro da lesão quando comparado com plantas não tratadas (Liu *et al.*, 1995b; Wei *et al.*, 1996). A aplicação no solo de *P. fluorescens* strain CHAO induziu proteção sistêmica contra o vírus que causa necrose em plantas de tabaco (Tobacco necrosis virus – TNV) (Maurhofer *et al.*, 1994, 1998). O tratamento com *Bacillus subtilis* induziu a proteção contra o nematóide *Meloidogyne incognita* e

M. arenaria em plantas de algodão (Sikora, 1988). Diversos isolados de PGPR foram capazes de induzir resistência sistêmica em mudas de eucalipto contra *Puccinia psidii* (Teixeira, 2001).

2.1.2.5- Parasitismo

Muitos isolados de bactérias possuem enzimas capazes de lisar células fúngicas, como, por exemplo, quitinases, envolvidas na degradação da quitina, principal componente da parede celular desse grupo de organismos, gluconases, proteases e lipases (Chet & Inbar, 1994). A inoculação microbiológica de sementes de tomate com PGPR, *Azospirillum* sp., *Azotobacter chroococcum* e *Pseudomonas fluorescens*, aumentou a massa fresca das plantas de tomate e reduziu a incidência de podridão e mela de *Rhizoctonia*. Foi encontrada correlação negativa (-0,85) entre a colonização de escleródios pelas PGPR e a germinação dos escleródios, e também entre o número de unidades formadoras de colônias das PGPR no solo rizosférico das plantas e a incidência de doença (Gupta et al., 1995). A maioria dessas enzimas líticas são codificadas por um único gene, facilitando a clonagem e transferência para isolados que não possuem essa habilidade. O gene da quitinase de *Serratia marcescens* foi introduzido em um isolado de *P. fluorescens* promotor de crescimento e efetivo no controle de *Rhizoctonia solani*, aumentando a sua eficácia de biocontrole (Koby et al., 1994).

2.1.2.6- Produção de Compostos voláteis tóxicos

Os principais compostos voláteis produzidos por rizobactérias que podem atuar no controle biológico são amônia e ácido cianídrico (HCN). Vários isolados de *Pseudomonas* produzem HCN na rizosfera, o que inibe o crescimento de vários organismos como pode ser observado no sistema de controle biológico *P. fluorescens* X *Thielaviopsis* sp. em fumo (Défago et al., 1990).

Altas concentrações desse ácido podem ser tóxicas também para algumas plantas, podendo ter efeito deletério sobre o crescimento das mesmas, como já foi observado em plantas de batata (Shippers et al., 1987). No entanto esse composto pode também atuar promovendo o desenvolvimento de pêlos radiculares (Luz, 1996).

2.1.2.7- Promoção de associações simbióticas

Rizobactérias podem ter um efeito positivo no desenvolvimento de relações simbióticas entre plantas e fungos micorrízicos e/ou isolados de rizóbios. Essas bactérias com capacidade de colonizar o sistema radicular micorrizado e sua área de influência (micorizosfera), propiciando um aumento de micorrização, são chamadas de “Mycorrhization Helper Bacteria (MHB) (Garbayer, 1994). Alguns isolados de *Pseudomonas* promotores de crescimento em coníferas podem especificamente estimular a performance de plântulas micorrizadas no campo por um mecanismo mais complexo do que um simples aumento da infecção fúngica (Shishido et al., 1996).

Produção de fitohormônios, que contribuem para mudanças na morfologia radicular, aumento da disponibilidade de fósforo no solo, produção de antibióticos e proteínas ligadas à membrana celular são propostos como possíveis mecanismos envolvidos no aumento da nodulação de rizóbios em leguminosas por PGPR (Mahaffee & Kloepper, 1994).

As rizobactérias utilizam vários mecanismos para sobreviver na rizosfera e suprimir o ataque de patógenos às plantas, podendo ocorrer mais de um mecanismo ao mesmo tempo (Melo, 1998).

3- MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno do Departamento de Fitopatologia/Bioagro e no viveiro de Pesquisa Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa – MG).

Realizaram-se dois ensaios. No primeiro, foram testados dez isolados de rizobactérias em suspensão salina, no segundo, testaram-se quatro isolados (pré-selecionados) nas formulações líquida, sólida e o inóculo em suspensão salina. O ensaio foi repetido, para confirmação dos resultados. As sementes de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) utilizadas foram coletadas na mata da silvicultura da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa- MG).

3.1- Seleção de isolados

Este ensaio foi realizado no período compreendido entre 27/03/2004 e 06/05/2004.

3.1.1.- Isolados testados

Testaram-se os isolados de rizobactérias pré-selecionados para eucalipto (Teixeira, 2001), sendo eles, FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus*

subtilis), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.) e VC2 (não identificado).

3.1.2- Produção e preparo do inóculo

A suspensão de cada rizobactéria foi preparada no laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno do Departamento de Fitopatologia/Bioagro a 0,2 de absorvância aferida em espectrofotômetro a 540 nm, equivalente a 10^8 ufc (unidades formadoras de colônias)/mL. Para a produção do inóculo, suspensões bacterianas em solução salina (0,85 %) foram obtidas a partir de colônias cultivadas em meio 523 de KADO e RESKETT (1970) por 48 h a 27 °C. A fim de confirmar a concentração de inóculo aplicada e a viabilidade das células bacterianas, em cada ensaio foi reservada uma alíquota de cada suspensão para posterior avaliação em espectrofotômetro.

Para o inóculo em suspensão salina foi adicionada 1% de leite em pó como fonte alimentar inicial para as rizobactérias. A suspensão de inóculo dos respectivos isolados, equivalente a 5 mL de suspensão por 50 cc (centímetros cúbicos) de substrato foi aplicada no substrato e homogeneizada em caixas de plástico.

3.1.3– Rizobacterização do substrato

Para a rizobacterização do substrato utilizaram-se 11 caixas plásticas. Em 10, aplicaram-se 5 litros de substrato (vermiculita: casca de arroz carbonizada (1:1)), 0,5 litros da suspensão do inóculo (5 mL/ tubete) a 0,2 de absorvância (10^8 ufc/mL) contendo cada rizobactéria, diluído em 0,5 L de água, 0,04 g de superfosfato simples e 1 % de leite em pó. Na testemunha o substrato foi tratado com água (1 L) e superfosfato simples (0,04 g). Para cada tratamento foram utilizados 100 tubetes plásticos de 50 mL de capacidade.

O substrato inoculado foi homogeneizado e distribuído nos tubetes montados em bandejas de 96 células devidamente etiquetadas por repetição e tratamento. Cada bandeja continha 60 tubetes, com a exceção de uma que continha 20. As bandejas foram levadas para casa de vegetação, onde se procedeu a semeadura de duas sementes em cada tubete. A irrigação foi feita duas vezes por dia (de manhã e pela tarde) utilizando o sistema de irrigação por aspersão. Após 40 dias avaliou-se o experimento.

3.1.4- Variáveis avaliadas

Foram avaliadas a porcentagem de germinação, o peso de matéria seca de raízes e da parte aérea aos 40 dias.

Para avaliação da porcentagem de germinação todas as sementes germinadas foram contadas por tratamento e repetição e para determinação do peso de matéria seca de raízes e da parte aérea, as raízes e parte aérea de 10 plantas de cada repetição, foram destacadas, lavadas, colocadas em sacos de papel, secas em estufa a 70°C por 72 h e pesadas.

3.1.5- Procedimentos estatísticos

O ensaio foi montado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) contendo 11 tratamentos (10 rizobacterias + 1 testemunha) com 5 repetições de 20 mudas cada totalizando 1100 plantas.

As análises estatísticas foram feitas no programa SAEG. As médias foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de significância.

3.2- Testes de formulações

Este ensaio foi realizado no período compreendido entre 16/07/2004 e 26/08/2004. Em 28/08/04 foi repetido e avaliado em 28/09/04 para confirmação dos resultados.

3.2.1- Isolados testados

Dos dez isolados testados no ensaio um, quatro que se destacaram como os mais promissores (MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.), FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*) e CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*)) foram testados nas formulações líquida e sólida, comparado com o inóculo em suspensão salina, produzido como descrito anteriormente (item 1.2).

3.2.2- Produção das formulações líquida e sólida

Foram utilizadas duas formulações de rizobactérias, uma líquida e outra sólida, produzidas pela Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas, com o objetivo de aumentar a sobrevivência e a eficiência das rizobactérias.

3.2.3- Rizobacterização do substrato

Para a rizobacterização do substrato, 100 g do inoculante sólido a 10^9 ufc/g, 100 mL do inoculante em líquido a 10^9 ufc/mL, diluído em 900 mL de água e 500 mL do inóculo em suspensão salina a 10^8 ufc/mL, diluído em 500 mL de água e 1 % de leite em pó, foram homogeneizados individualmente em caixas plásticas contendo 5 litros de substrato (vermiculita : casca de arroz carbonizada (1:1)) e 0,04 g de superfosfato simples. Para a testemunha, foi adicionado ao substrato apenas água (1 L) e fertilizante (0,04 g).

Após a homogeneização, o substrato foi distribuído em tubetes de 50 mL de capacidade, que foram colocados em 20 bandejas (96 células) devidamente etiquetadas por repetição e tratamento, cada bandeja continha 80 tubetes. As bandejas foram levadas para casa de vegetação, onde se procedeu a semeadura de uma semente em cada tubete. A irrigação foi feita duas vezes por dia (de manhã e pela tarde) utilizando o sistema de irrigação por aspersão. Após 40 dias, avaliou-se o segundo experimento e após 30 dias, o terceiro.

3.2.4- Variáveis avaliadas

Foram avaliadas a porcentagem de germinação, o peso de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea, como descrito no item 1.4 exceto que, neste ensaio todas as plantas foram avaliadas quanto ao peso de matéria seca de raízes e da parte aérea. Avaliou-se também a altura das plantas aos 40 dias com o uso de régua graduada em centímetros. Devido à perda de folhas das mudas de sibipiruna, na repetição do ensaio, as variáveis foram avaliadas aos trinta dias.

3.2.5 - Procedimentos estatísticos

O delineamento experimental do ensaio foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial (4 (isolados) x 3 (duas formulações e o inóculo em suspensão salina)),

com um tratamento adicional (testemunha), com 5 repetições de 20 mudas totalizando 1300 plantas. Foram realizadas a análise do fatorial e a análise do fatorial com o tratamento adicional (Garcia, 2001).

Como o ensaio foi instalado em esquema fatorial e com um tratamento adicional, foi necessário fazer a análise estatística considerando o efeito de isolado, de formulação e a interação “isolado*formulação”. Quando a probabilidade foi menor que 0,05 houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. As análises estatísticas foram feitas no programa STATISTICA e no SAEG. As médias foram comparadas, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para verificar se os dados do segundo e da sua repetição poderiam ser analisados conjuntamente realizou-se o Teste F. As variâncias foram obtidas dividindo-se o quadrado médio do resíduo das variáveis do segundo ensaio pelos do terceiro. Segundo Gomes e Garcia (2002) quando o F calculado for menor que sete faz-se a análise conjunta, quando for maior que sete, não é possível a sua realização.

As porcentagens de ganhos individuais, para cada tratamento, foram calculadas em relação à testemunha. Para as porcentagens de ganhos gerais, para cada variável, foi tirada a média entre os tratamentos utilizando-se as porcentagens de ganhos individuais.

4- RESULTADOS

4.1- Seleção de isolados

Verificou-se aumento significativo na matéria seca de raízes e da parte aérea para todos os isolados de rizobactérias testados, em relação à testemunha. Para porcentagem de germinação a maioria dos isolados diferiu significativamente da testemunha, a exceção do 3918 e CIIB. Apesar disso o índice de germinação para esses isolados foi numericamente maior comparando-se com a testemunha. (Tabela 1).

Apesar de não ter havido diferença estatística entre a maioria dos isolados, o FL2 foi numericamente superior aos demais, para porcentagem de germinação, pois aumentou em 36,8 % o número de sementes germinadas enquanto o S2 promoveu um ganho de 35,6 %. Utilizando-se o isolado FL2, também se obteve boa resposta para peso de matéria seca de raízes e da parte aérea. Apesar do isolado CIIB não ter diferido estatisticamente da testemunha e do 3918 quanto à porcentagem de germinação, para matéria seca de raízes ele foi significativamente superior à testemunha e numericamente superior aos demais isolados. Para matéria seca da parte aérea, o ganho obtido com o isolado MF4 foi numericamente superior comparando-se com os demais isolados. Para matéria seca de raízes, o ganho obtido com o isolado MF4 foi inferior apenas ao obtido com o isolado CIIB. Com o isolado FL2, também obteve boas respostas quanto ao incremento de matéria seca de raízes e parte aérea. Os isolados FL2, MF4, MF2 e CIIB foram selecionados para os testes subsequentes em dois tipos de formulações.

Para os isolados significativamente superiores à testemunha os ganhos em germinação variaram de 21,8 % a 36,8 %, com uma média de 29,3 %. Já para matéria seca da parte aérea e do sistema radicular os ganhos variaram de 20,0 % a 36,3 %, com média de 27,2 % e de 66,7 % a 105,7 %, com média de 83,6 %, respectivamente.

TABELA 1– Porcentagem de sobrevivência, peso da matéria seca do sistema radicular e da parte aérea de 10 mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) aos 40 dias, para os isolados FL2, S2, Ca, VC2, MF4, MF2, S1, R1, 3918 e CIIB.

Isolados	Variáveis					
	Sobrevivência (%)		Matéria seca de raiz (mg)		Matéria seca da parte aérea (mg)	
FL2	59,5 A	(36,8)	788 A	(87,6)	2140 A	(33,8)
S2	59,0 A	(35,6)	700 A	(66,7)	2040 A	(27,5)
Ca	59,0 A	(35,6)	718 A	(70,9)	1930 A	(20,6)
VC2	56,0 A	(28,7)	756 A	(80,0)	2000 A	(25,0)
MF4	55,5 A	(27,6)	860 A	(104,7)	2180 A	(36,3)
MF2	54,5 A	(25,3)	796 A	(89,5)	2120 A	(32,5)
S1	53,5 A	(22,9)	710 A	(69,0)	2078 A	(29,9)
R1	53,0 A	(21,8)	760 A	(80,9)	1980 A	(23,8)
3918	51,5 B	–	760 A	(80,9)	1920 A	(20,0)
CIIB	51,0 B	–	864 A	(105,7)	1960 A	(22,5)
Test.	43,5 B	–	420 B	–	1600 B	–
Ganh. médios (%)	29,3		83,6		27,2	
CV (coef. de variação) %	12,5		12,9		12,3	

Médias seguidas de mesma letra em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott, em nível de 5% de significância.

() Ganho médio

Fonte: Dados da pesquisa

4.2- Teste de formulações

Houve diferença entre o segundo ensaio e a repetição. Ao dividir-se o quadrado médio do resíduo das variáveis do segundo ensaio pelos do terceiro (para obtenção das variâncias), observou-se que o F calculado foi maior que sete, não sendo possível a realização da análise conjunta dos dois ensaios (Garcia, 2002).

Para o segundo ensaio, todos os isolados testados promoveram aumento significativo na altura, matéria seca do sistema radicular e da parte aérea (efeito de isolado), em relação à testemunha, mas não se observou efeito de formulação e nem interação significativa (isolado*formulação). Todos os isolados nas formulações líquida e sólida e com o inóculo em suspensão salina não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes da testemunha. Apenas para porcentagem de germinação não houve diferença estatística significativa entre os isolados testados e a testemunha, embora tendessem a ser superiores a ela (Tabela 2).

Para matéria seca de raízes e da parte aérea não houve diferença estatística entre os isolados testados, todavia, os isolados MF4 e MF2 foram numericamente superiores ao CIIB e FL2 (Tabela 2).

Os ganhos em germinação variaram de 12,4 % a 19,0 %, com uma média de 16,4 %. Para matéria seca da parte aérea e do sistema radicular os ganhos variaram de 50,45 % a 65,60 %, com média de 57,90 % e de 42,46 % a 57,53 %, com média de 51,8 %, respectivamente (Tabela 2).

Em geral, os isolados numericamente superiores para porcentagem de germinação não foram os que induziram maiores valores de peso de matéria seca de raízes e parte aérea, mas os isolados que promoveram maiores ganhos na matéria seca da parte aérea, em geral, foram os que também induziram maiores massas de raízes. Entre os isolados testados, verificou-se variação na altura média das mudas.

TABELA 2- Porcentagem de germinação, altura da parte aérea e massa de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea por semente germinada de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) aos 40 dias, para os isolados MF4, MF2, FL2 e CIIB, nas formulações líquida, sólida e com o inóculo em suspensão salina. Ensaio 2

Isolados	Variáveis							
	Germinação (%)		M. S/ P.A (mg)		M.S/ Raiz (mg)		Altu./ P.A (cm)	
MF4	82,0	(17,1)	265,84	A (65,60)	114,0	A (56,16)	8,6	AB (17,80)
CIIB	83,3	(19,0)	241,55	A (50,45)	104,0	A (42,46)	8,3	B (13,69)
FL2	82,0	(17,1)	250,69	A (56,14)	110,0	A (50,68)	8,9	A (21,91)
MF2	78,7	(12,4)	255,81	A (59,33)	115,0	A (57,53)	8,4	AB (15,06)
Test	70,0	-	160,55	B -	73,00	B -	7,3	C
Ganho Médio (%)	16,40		57,90		51,80		17,12	
Coef.Varição(%)	9,8		19,5		20,0		8,5	

Médias seguidas de mesma letra em uma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

MS/P.A- Matéria seca da parte aérea

MS/R- Matéria seca de raiz

Altu/P.A- Altura da parte aérea

()- Ganho médio

Fonte: Dados da pesquisa

No terceiro ensaio, com à exceção do isolado FL2 na formulação líquida (para matéria seca da parte aérea), todos os isolados de rizobactérias nas formulações líquida e sólida e em suspensão salina promoveram aumento significativo na porcentagem de germinação, altura, matéria seca de raízes e da parte aérea, comparando-se com a testemunha. Apenas para porcentagem de germinação não houve efeito entre isolado*formulação, ou seja, não houve diferença estatística significativa entre as formulações e o inóculo em suspensão salina, apesar de terem diferido da testemunha, não sendo possível indicar o melhor isolado para cada formulação e a melhor formulação para cada isolado. Para altura, matéria seca de raízes e da parte aérea houve efeito entre isolado* formulação (Tabela 3 e 4), sendo possível indicar o melhor isolado para cada formulação e a melhor formulação para cada isolado.

Para a formulação líquida, os isolados que promoveram maiores ganhos em altura e maior incremento na matéria seca da parte aérea foram MF4, CIIB e MF2, já para aumento da matéria seca do sistema radicular foi o isolado MF4 e depois, o CIIB. No geral, para esta formulação os melhores isolados foram o MF4 e o CIIB. Para a formulação sólida os maiores ganhos em altura e matéria seca da parte aérea foram promovidos pelos isolados MF4, MF2 e FL2 e para matéria seca de raízes pelos isolados MF2 e FL2. No geral, os melhores isolados para a formulação sólida foram FL2 e MF2. Para o inóculo em suspensão salina os isolados mais eficientes para incremento em altura, em matéria seca de raízes e da parte aérea foram MF4 e FL2 (Tabela 3).

Para formulação líquida os ganhos em altura variaram de 20,0 % a 42,0 %, com média de 35,5 %; para matéria seca da parte aérea, de 22,4 a 25,7 %, com média de 23,9 %; para matéria seca do sistema radicular de 31,8 % a 65,9 %, com média de 47,1 % (Figura 1 e 2). Para a formulação sólida os ganhos em altura variaram de 32,7 % a 36,0 %, com média de 35,0 %, para matéria seca de raízes e parte aérea variaram de 20,4 % a 61,4 %, com média de 46,5 % e de 16,4 % a 24,3 %, com média de 19,4 %, respectivamente. Para o inóculo em suspensão salina os ganhos em altura variaram de 23,6 % a 40 %, com média de 30 %, para matéria seca de raízes e da parte aérea variaram de 29,5 % a 36,3 %, com média de 32,3 % e de 11,2 % a 20,3 %, com média de 15,3 %, respectivamente. Os ganhos para a formulação líquida, sólida e o inóculo em suspensão salina, levando-se em conta todos os

isolados e as variáveis: altura, matéria seca de raízes e da parte aérea foram de 34,6 %, 34,3 % e 25,8 %, respectivamente.

Ao analisar-se a porcentagem de ganho de todos os isolados testados nas diferentes formulações, observou-se um maior incremento na matéria seca do sistema radicular, em comparação à matéria seca da parte aérea e altura. A porcentagem de ganho geral para matéria seca de raízes, levando-se em conta todas as formulações chegou a 41,9 %.

TABELA 3 – Efeito dos isolados MF4, MF2, CIIB e FL2 em formulações líquida e sólida e com o inóculo em suspensão salina na porcentagem de germinação, altura, matéria seca de raiz e da parte aérea de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), aos 30 dias.

Form.	Isolados							
		MF4	CIIB	MF2	FL2	Testemunha	Ganho Médio (%)	Coefficiente de Variação (%)
Líquida	Sobreviv.(%)	82 A (18,3)	78 A (13,0)	75 A (8,7)	78 A (13,0)	69 B	13,4	4,4
	MSPA (mg)	186 A (22,4)	188 A (23,7)	191A (25,7)	171 B	152 B	23,9	4,5
	MSR (mg)	73 A (65,9)	68 B (54,5)	60 C (36,4)	58 C (31,8)	44 D	47,1	4,8
	Haltura (cm)	7,7 A (40,0)	7,7 A (40,0)	7,8 A (42)	6,6 B (20)	5,5 C	35,5	3,9
Sólida	Sobrev. (%)	80 A (15,9)	79 A (14,5)	81 A (17,4)	81 A (17,4)	69 B	16,3	4,3
	MSPA (mg)	180 AB (18,4)	177 B (16,4)	189 A (24,3)	180AB(18,4)	152 C	19,4	4,0
	MSR (mg)	53 C (20,4)	64 B (45,4)	70 A (59)	71 A (61,4)	44 D	46,5	4,4
	Haltura (cm)	7,5 A (36,0)	7,3 B (32,7)	7,5 A (36,0)	7,5 A (36,0)	5,5 C	35,0	2,4
S. Salina	Sobrev. (%)	79 A (14,5)	78 A (13,1)	79,0A (13,1)	78 A (13,1)	69 B	13,8	4,1
	MSPA (mg)	183 A (20,3)	169 B (11,2)	173 B (13,8)	176AB(15,8)	152 C	15,3	4,1
	MSR (mg)	60 A (36,3)	57 B (29,5)	57 B (29,5)	59 A (34,1)	44 C	32,3	3,6
	Haltura (cm)	7,7 A (40,0)	6,9 B (25,5)	6,8 B (23,6)	7,2AB(30,9)	5,5 C	30,0	7,1

Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância

Form. – Formulação

(-) - Ganho médio para cada variável em relação à testemunha

Sobreviv.- Sobrevivência

MSPA- Matéria seca da parte aérea

MSR- Matéria seca de raízes

Fonte: Dados da pesquisa

Para o isolado CIIB, não foi observada diferença estatística entre a formulação líquida e sólida, para todas as variáveis analisadas, mas a formulação sólida foi igual ao inóculo em suspensão salina para matéria seca da parte aérea e altura. Para o isolado FL2, a formulação que proporcionou maiores ganhos em altura, matéria seca de raízes e da parte aérea foi a sólida, apenas para altura, a formulação sólida não diferiu estatisticamente do inóculo em suspensão salina, mas foi superior à formulação líquida. Para o isolado MF2, as formulações líquida e sólida proporcionaram maiores ganhos na matéria seca de raízes e da parte aérea comparando-se com o inóculo em suspensão salina, apenas para altura, a formulação líquida foi superior à sólida, sendo que esta última não diferiu do inóculo em suspensão salina. O isolado MF4 apresentou maiores ganhos na matéria seca de raízes quando formulado em líquido, para matéria seca da parte aérea não houve diferença estatística entre as formulações e o inóculo em suspensão salina. Para altura, a formulação líquida não diferiu do inóculo em suspensão salina, mas foi superior a formulação sólida (Tabela 4). No geral, para os isolados CIIB, MF2 e MF4 a melhor formulação foi a líquida e para o isolado FL2 a sólida. Com o isolado CIIB em formulação líquida obteve-se ganhos de 19 % e 11 % na matéria seca de raízes e da parte aérea, respectivamente, comparando-se com o inóculo em suspensão salina. Utilizando-se o isolado MF4 em formulação líquida, o ganho em relação ao inóculo em suspensão salina foi de 21,6 % para matéria seca de raízes, mas para parte aérea não houve diferença estatística entre a formulação líquida e o inóculo em suspensão salina. Para o isolado MF2 líquido, os ganhos foram de 14,0 % na matéria seca de raiz e 10,4 % para matéria seca da parte aérea, comparando-se com o inóculo em suspensão salina. Para o isolado FL2 sólido, o incremento na biomassa de raízes foi de 18,6 % e na biomassa da parte aérea 5,6 %, comparando-se com o inóculo em suspensão salina. Já para o isolado MF2 em líquido, os ganhos foram de 14,0 % na matéria seca de raiz e 10,4 % para matéria seca da parte aérea, comparando-se com o inóculo em suspensão salina.

Em geral, a formulação que propiciou maiores ganhos em altura, matéria seca do sistema radicular e da parte aérea para a maioria dos isolados foi a líquida, seguido da sólida e por último o inóculo em suspensão salina.

TABELA 4 –Efeito das formulações líquida e sólida e o inóculo em suspensão salina no desempenho dos isolados MF4, MF2, CIIB e FL2 na germinação, altura, matéria seca de raízes e da parte aérea de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), 40 dias após sementeira.

Form.	Isolados															
	CIIB				FL2				MF2				MF4			
	Ger. (%)	MS/ Raiz (mg)	MS/ P.A (mg)	Alt/ P.A (cm)	Germ (%)	MS/ Raiz (mg)	MS/ P.A (mg)	Alt/ P.A (cm)	Ger. (%)	MS/ Raiz (mg)	MS/ P.A (mg)	Alt/ P.A (cm)	Ger. (%)	MS/ Raiz (mg)	MS/ P.A (mg)	Alt/ P.A (cm)
Líquido	78	68 A	188 A	7,6 A	78 A	57 B	170 B	6,4 B	75 A	65 A	191 A	7,8 A	82 A	73 A	186 A	7,7 A
Turfa	79	65 A	177 AB	7,3AB	81 A	70 A	186 A	7,5 A	81 A	69 A	189 A	7,0 B	80 A	55 C	180 A	7,3 B
Susp. salina	78	57 B	169 B	6,9 B	78 A	59 B	176 B	7,2 A	79 A	57 B	173 B	6,8 B	79 A	60 B	183 A	7,7 A
CV (%)	3,1	5,2	4,5	4,4	4,1	3,9	3,7	6,6	4,5	3,7	4,1	5,3	4,3	3,9	4,0	3,7

Médias seguidas de mesma letra em uma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância

Ger. - Germinação

MS/Raiz – matéria seca de raiz

MS/P.A – matéria seca da parte aérea

Alt/P.A – Altura da parte aérea

Fonte: Dados da pesquisa

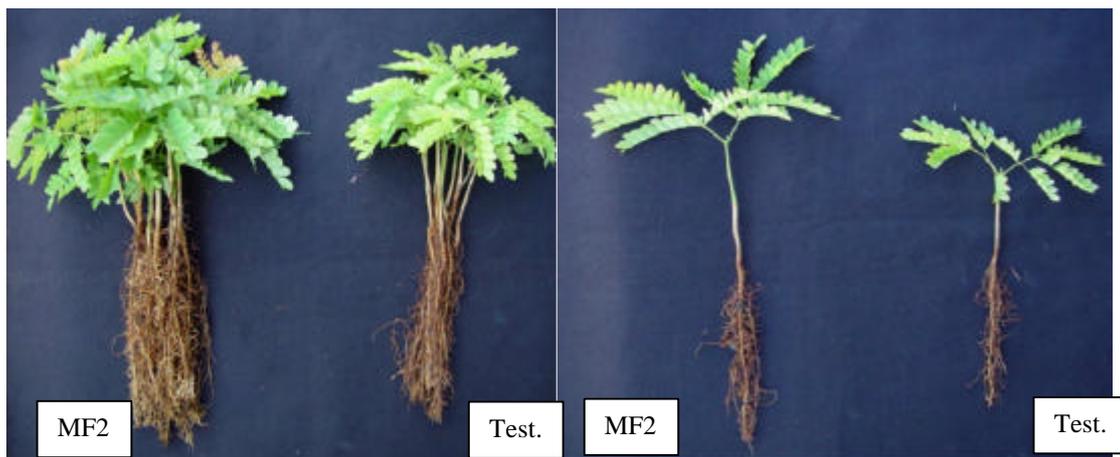


FIGURA 1- Mudras de sibipiruna aos 30 dias após sementeira tratadas com o isolado MF2 líquido e testemunha (sem rizobactéria).

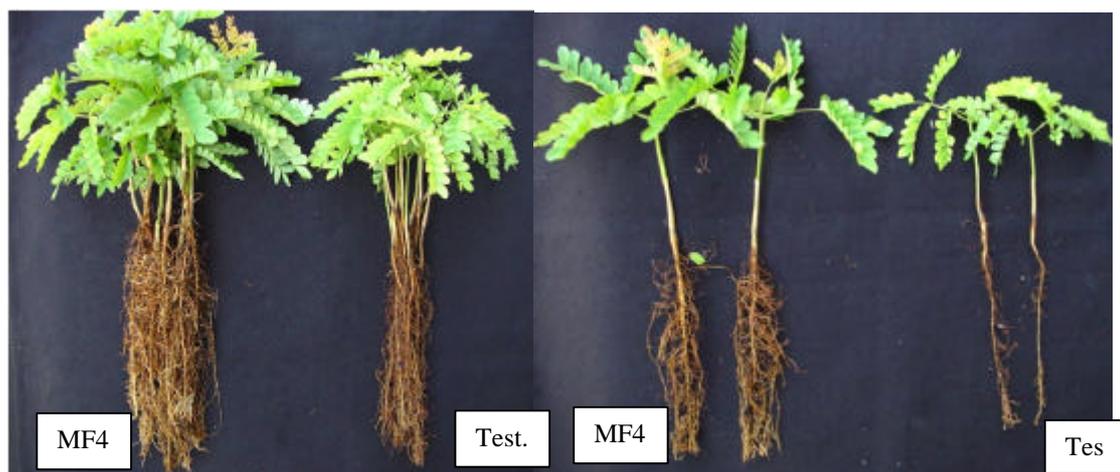


FIGURA 2- Mudras de sibipiruna aos 30 dias após sementeira tratadas com o isolado MF4 líquido e testemunha (sem rizobactéria).

5- DISCUSSÃO

Isolados de rizobactérias veiculados no substrato, aumentaram a germinação das sementes, a altura, o peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de mudas seminais de sibipiruna. Muitos autores relatam o envolvimento de rizobactérias no crescimento do sistema radicular de várias culturas. Em essências florestais, observou-se o efeito de rizobactérias no crescimento de mudas oriundas de sementes de *Pinus*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga* e abeto vermelho (Chanway, 1992; Chanway e Holl, 1993; Chanway, 1997; Eneback et al, 1998). Em *Eucalyptus camaldulensis* foi observado um incremento de 44 % na sua biomassa após co-inoculação com *Azobacter chroococcum* e *Bacillus megaterium* (Mohammad e Prasad, 1988). Segundo Teixeira (2001), os isolados rizobacterianos FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus subtilis*), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.) e VC2 (não identificado) atuaram com excelentes indutores de enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp., promovendo ganhos de até 110 % no enraizamento médio e 250 % no peso de matéria seca de raiz.

Embora os autores Schrot e Hancock (1982), tenham relatado que isolados promotores de crescimento em uma espécie de planta podem não ser efetivo para outra, isto não foi observado para *Eucalyptus* spp. e sibipiruna. Os resultados mostram que os mesmos isolados selecionados para eucalipto por Teixeira (2001) que aumentaram a biomassa de clones de *Eucalyptus* spp., também apresentaram grande potencial para

incremento de biomassa de mudas seminais de sibipiruna, isto quer dizer que os isolados de rizobactérias extraídos da região da rizosfera de mudas de *Eucalyptus* spp., não são específicos para essa espécie, podendo ser utilizados para aumento de biomassa de mudas de sibipiruna e também, apresentando potencial para realização de testes com outras espécies nativas e também agronômicas. Em trabalhos realizados por Neves et al. (2004), observaram-se incrementos de 67 % na biomassa da parte aérea e 120 % na biomassa do sistema radicular em mudas de *Hovenia dulcis* (Uva do Japão), quando tratadas com um isolado de *Pseudomonas* (MF2).

Dos dez isolados testados, sete são dos gêneros mais comentados relatados como promotores de crescimento, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Teixeira, 2001). Neste trabalho, em geral, os isolados que mais se destacaram foram os do gênero *Pseudomonas* (MF2 e MF4). Em outros trabalhos também foi observado o efeito de isolados de *Pseudomonas* no crescimento de plantas. Em testes realizados com *Pseudomonas fluorescens* em Citrus: limão rugoso (*Citrus jambhiri*) e laranja doce (*C. sinensis*) verificaram-se um estímulo no crescimento de plantas da ordem de 116 %, após 10 meses da inoculação (Gardner et al., 1984). Foi observado, também, um efeito positivo de um isolado de *Pseudomonas putida* no enraizamento de estacas de *vigna radiata* e feijão mungo (Maiak et al., 1997). Em estacas de *Eucalyptus* spp., observou-se um incremento de 62,8 % no enraizamento e 24 % na matéria seca do sistema radicular, quando tratadas com um isolado de *Pseudomonas* (Teixeira, 2001).

Os isolados formulados utilizados neste experimento, também vêm sendo testados em eucalipto. Os resultados destes testes têm mostrado que com a utilização da formulação líquida tem-se obtido melhores resultados comparando com a formulação sólida, isto pode ser explicado pelo fato de que com a formulação líquida seja possível obter melhor homogeneização do inoculante ao substrato de produção de mudas, o que foi apontado como um problema da formulação sólida (Alfenas, informação pessoal). Este problema, também pode ter ocorrido no ensaio 3, visto que para a maioria dos isolados, a formulação líquida promoveu um maior incremento na altura, matéria seca de raízes e da parte aérea, exceto para o isolado FL2, que no terceiro ensaio, foi melhor formulado sólido, neste caso, a mistura pode ter sido melhor homogeneizada.

As formulações líquida e sólida, em geral, propiciaram maiores ganhos tanto na porcentagem de germinação como na altura e na matéria seca de raízes e da parte aérea, comparando-se com o inóculo em suspensão salina. Isto mostra que rizobactérias formuladas apresentam grande potencial de uso, pois além de terem

promovido um maior crescimento das mudas de sibipiruna, elas mantêm a viabilidade das células bacterianas por um período maior, devido à presença de um agente estabilizante fornecedor de nutrientes para a bactéria. No caso do inóculo em suspensão salina, as bactérias perdem a viabilidade em um tempo menor, pois não possuem nutrientes para manter o crescimento da população de células bacterianas. Em testes realizados no Laboratório de Patologia Florestal da Interação Planta/Patógeno para acompanhamento da sobrevivência dos isolados em formulações líquida e sólida, observou-se que a sobrevivência das células bacterianas é mantida, sem variação, por aproximadamente 35 dias, a partir desse período ela começa a cair, isto pode explicar o fato do segundo ensaio não ter apresentado a mesma resposta do terceiro, visto que foi instalado 42 dias após o segundo ensaio e com o mesmo lote de rizobactérias. Uma outra explicação seria a diferença de temperatura na época da realização dos dois ensaios. No período da realização do segundo ensaio (16 de julho) até a avaliação (26 de agosto) observou-se menor temperatura e umidade relativa do ar no viveiro, comparando-se com o período de realização (28 de agosto) e avaliação (28 de setembro) do terceiro ensaio em que foi observada temperatura e umidade relativa mais elevada, podendo interferir no isolado e na interação do isolado com a planta. Existem evidências de que a resposta de isolados de rizobactérias aplicados no substrato de espécies arbóreas está relacionada com as condições ambientais (Enebeck et al., 1998).

Além da vantagem de serem encontradas em grande quantidade no solo, as rizobactérias são cultivadas em meio de cultura, facilitando o uso de formulações comerciais (Weller, 1988). Fertilizantes bacterianos não simbiotes (*Azobacter* e *Bacillus*) foram primeiramente empregados no final do século XIX (1885) na antiga União Soviética. No mercado norte-americano já existem seis formulações a base de PGPR's, como por exemplo, o produto Kodiak à base de *Bacillus subtilis* usado no controle de tombamento de mudas em diversas culturas (Turner e Backman, 1991; Luz, 1996), o K-84 (*Agrobacterium radiobacter*) para o controle de doença da galha (*Agrobacterium tumefaciens*) e o Dagger G (*Pseudomonas fluorescens*) utilizado para controle da podridão de raiz de algodão (*Rhizoctonia e Pythium*) (Kerr, 1980). No Brasil há a necessidade de reforçar os investimentos e pesquisas que vise o desenvolvimento de tecnologias de produção e formulação dos agentes em escala industrial.

Os isolados de rizobactérias podem ter agido de forma direta ou indireta no crescimento de mudas de sibipiruna. Em mecanismos indiretos as rizobactérias atuariam com agentes de biocontrole, suprimindo organismos deletérios ou patogênicos às

plantas, ou beneficiando organismos benéficos às mesmas. Muitas vezes o efeito negativo de um microrganismo sobre a planta ocorre de uma forma dificilmente perceptível não ocorrendo infecção ou aparecimento de sintomas típicos como os induzidos por organismos patogênicos (Teixeira, 2001). Geralmente esses microrganismos afetam a planta por meio da produção de metabólitos tóxicos e seus efeitos se restringem à diminuição do desenvolvimento em função de atuarem negativamente sobre os processos de germinação, brotação e enraizamento (Schippers et al., 1987). Embora ainda não totalmente esclarecido, o efeito direto no crescimento de plantas provavelmente decorre da produção de fitohormônios como auxinas e giberelinas, inibição da síntese de etileno e mineralização de nutrientes (Mahaffee e Kloeper, 1994).

Embora a determinação dos mecanismos de promoção não fosse objeto deste estudo, é provável que a produção de fitohormônio, síntese de etileno e solubilização de fosfato estejam envolvidos. Estima-se que 80 % dos isolados bacterianos presentes no solo são capazes de produzir AIA (Glick et al., 1999). Compostos indólicos, tais como ácido indol-pirúvico, indol-acetamida e ácido-indol-carboxílico, também podem estar envolvidos (Costacurta e Vanderleyder, 1995). Além disso, o efeito dos isolados pode ocorrer não só pela produção direta de auxinas, mas também, via estímulo à síntese desses fitohormônios pela própria planta (Gaudin et al., 1994). Um mutante de *P. fluorescens* super produtor de AIA estimulou o desenvolvimento radicular de estacas de groselheira-preta (Dubeikovsky, et al., 1993).

Outro mecanismo direto que poderia estar envolvido no crescimento de mudas de sibipiruna seria a inibição da síntese de etileno. Segundo Haal et al. (1996), um dos mecanismos mais importantes envolvidos na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias é a capacidade desses organismos em diminuir o nível endógeno de etileno nas mesmas. O etileno pode atuar como indutor de enraizamento em várias espécies de planta, no entanto o seu acúmulo apresenta efeito inibitório na posterior elongação das raízes formadas (Teixeira, 2001).

Vários pesquisadores demonstraram um aumento na absorção de fosfato por isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas* em várias culturas (Raj et al., 1981; Datta et al., 1982; Lifshitz et al., 1987), que foram isolados utilizados nesse trabalho. O fósforo, elemento pouco móvel no solo, é um dos principais elementos que pode ter sua absorção aumentada com a utilização de rizobactérias, não só pela capacidade de alguns

isolados solubilizarem esse elemento, como também, em decorrência da maior área de solo explorada pelo sistema radicular melhor desenvolvido (Teixeira,2001).

Os índices de matéria seca da raiz e parte aérea do segundo ensaio foram maiores do que no terceiro, isto é explicado pelo fato de que no segundo as mudas de sibipiruna foram avaliadas com quarenta dias e no terceiro com trinta, porque estavam perdendo as folhas (sem causa aparente). No primeiro ensaio foram avaliadas apenas dez plantas, pois o objetivo era avaliar algumas plantas com sessenta dias, mas isso não foi possível pelo mesmo motivo citado acima. No segundo e terceiro ensaios avaliou-se todas as plantas.

O uso de PGPR's (Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) durante a fase de produção de mudas de espécies nativas tende a ser uma alternativa com grande probabilidade de sucesso, podendo propiciar, ao mesmo tempo o aumento da germinação de sementes e um maior crescimento de mudas.

6- RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de rizobactérias promotoras de crescimento sobre a germinação de sementes e biomassa do sistema radicular e da parte aérea de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*). Utilizaram-se os isolados pré-selecionados para eucalipto. Foram realizados dois ensaios: um de seleção, utilizando-se isolados de rizobactérias em suspensão salina, e outro com os isolados selecionados em diferentes formulações (líquida e sólida) e em suspensão salina. O segundo ensaio foi repetido para confirmação dos resultados. No primeiro ensaio, testaram-se os isolados Ca, FL2, MF2, MF4, RC3, R1, 3918, S1, S2 e CIIB. Para tanto, amostras de substrato à base de vermiculita e casca de arroz carbonizada (1:1) foram tratados com 5 mL de uma suspensão de cada isolado ($OD_{540} = 0,2$ A)/ tubete de 55 cc de capacidade, correspondendo a cerca de 10 ufc/mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, cada uma constituída por 20 sementes. Aos 40 dias, avaliaram-se a porcentagem de germinação e a massa seca de raízes e da parte aérea. Verificou-se aumento significativo da matéria seca de raiz e da parte aérea para todos os isolados de rizobactérias testados, em relação à testemunha. Todos os isolados proporcionaram aumento significativo na germinação, à exceção do 3918 e CIIB que não diferiram da testemunha. Entre os isolados testados, quatro destacaram-se como os mais promissores (FL2, MF4, MF2 e CIIB) e subsequentemente foram testados em duas formulações (líquida e sólida) e em suspensão salina. Para cada tubete contendo 55 cc de substrato aplicou-se 1 mL da formulação líquida, 1 g da sólida e 5 mL do inóculo em suspensão salina. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 3) com um tratamento adicional (testemunha), empregou-se o mesmo número de repetições e de sementes do primeiro ensaio. O segundo ensaio foi avaliado aos 40 dias. Não se observou diferença significativa entre as formulações líquida, sólida e o inóculo em suspensão salina, mas todas diferiram significativamente da testemunha para altura, matéria seca do sistema radicular e da parte aérea. Os ganhos médios na matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz e altura da parte aérea foram de 57,9 %, 51,8 % e 17,12%, respectivamente. Este ensaio foi repetido e sua avaliação foi aos 30 dias, observou-se diferença significativa entre as formulações líquida, sólida e em suspensão salina, sendo que a formulação líquida promoveu maiores ganhos em altura, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, comparando-se com o inóculo em suspensão salina para os isolados CIIB e MF2. Para o isolado FL2, os maiores ganhos na matéria seca de raiz e da parte aérea foram promovidos quando veiculado na forma sólida. O isolado MF4 líquido não diferiu estatisticamente do MF4 em suspensão salina para germinação, altura e matéria seca da parte aérea. Ao analisar o ganho médio dos isolados superiores à testemunha nas diferentes formulações e em suspensão salina observou-se que ao aplicar a formulação líquida obtiveram-se ganhos em germinação, altura, matéria seca da raiz e da parte aérea de 13,4 %, 35,5 %, 47,1 % e 23,9 %, respectivamente. Com a formulação sólida os ganhos em germinação, altura, matéria seca da raiz e da parte aérea foram de 16,3 %, 35,0 %, 46,5 % e 19,4 %, respectivamente. Para o inóculo em suspensão salina os ganhos foram de 13,8 % para germinação, 30 % para altura, 32,3 % para matéria seca de riz e 15,3 % para matéria seca da parte aérea. Em geral, o melhor isolado foi o MF4 e a melhor formulação a líquida. As formulações líquida e sólida, comparando-se com o inóculo em suspensão salina, propiciaram maiores ganhos tanto na altura como na matéria seca de raízes e da parte aérea. Os mesmos isolados que apresentaram potencial para aumento da biomassa de estacas de *Eucalyptus* spp., também promoveram aumento na porcentagem de germinação e da biomassa de mudas de sibipiruna. Diante dos resultados obtidos, isolados de rizobactérias podem ser recomendados para otimizar a produção de mudas de sibipiruna, pois aumentaram tanto a porcentagem de sobrevivência das sementes, como também, o peso de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea, além do que a rizobacterização não demanda mudanças na rotina de produção de mudas nos viveiros. Com os resultados deste trabalho, também abre-se um leque para que rizobactérias sejam testadas em outras espécies nativas, agregando maior valor ao produto formulado.

O uso de PGPR's (Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) durante a fase de produção de mudas de espécies nativas tende a ser uma alternativa com grande probabilidade de sucesso.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIN, E.P.R., MELO, I.S., Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24:565-568, 2002.

BEYELER, M., KEEL, C., MICHAUX, P., HAAS, D., Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the against *Pythium* root rot. **FEMS Microbiology Ecology**, 28:225-233, 1999.

BENIZRI, E., COURTADE, A., PICARD, C., GUCKERT, A., Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. **Soil Biology and Biochemistry**, 30:1481-1484, 1998.

BERG, G., FRITZE, A., ROSKOT, N., SMALLA, K., Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. **Journal of Applied Microbiology**, 91:963-971, 2001.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Ann. Ver. Phytopathol.** 12: 181-197. 1974

CÂMARA, I.G. Atualização da legislação brasileira de conservação da Natureza. In: **Anais...** Campus do Jordão-SP, 1982. p.34, parte 1, ex: 1. Volume 16 A.

CHANWAY, C.P. Influence of soil biota on Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. **Canadian Journal of Botany** **70**: 1025-1031. 1992.

CHANWAY, C.P. & HOLL, F.B. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology** **39** (11): 1084-1088. 1993.

CHANWAY, C.P. & HOLL, F.B. Growth of outplanted lodgepole pine seedlings one years after inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Forest Science**, v.40, p.238-246. 1994.

CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v-43, n.1, p. 99-112. 1997.

CHET, I. & INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. Appl. **Biochemical Biotechnological**, v. 48:37-43. 1994.

COSTACURTA, A., VANDERLEYDER, J. Shintesis of phitohormones by plant associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.1, p.1-18. 1995.

DAL BELLO, G.M., MÓNACO, C.I., SIMÓN, M.R., Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18:627-636, 2002.

DATTA, M., BANIK, S., GUPTA, R.K. Studies on efficacy of a phythormone producing phosphate solubilinzis *Bacillus firmus* in angmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, v.69, p.365-373. 1982.

DÉFAGO, G.; BERLING, C. H., BURGER, U.; HAAS, D.; KHR, G.; KEEL, C.; VOISARD, C.; WIRTHNER, P.H. & WUTHRICH, B. Supression of balack root rot of tobacco by Pseudomonas strain: Potential applications and mechanisms. In: Biological control of soilborne plant pathogen (ed.) HOREBY, D., Wallingford: **CAB international**, p. 93-108. 1990.

DIGAT, B., EXPERT, J.M., BOSSIS, E. Ces bactéries qui protègent et stimulent les semences et les plantules. **PHM Revue Horticole**, n.341, p.16-21. 1993.

DUBEIKOVSKY, A.N.; MORDUKHOVA, E.A.; KOCHETKOV, V.V.; PLOKARPOVA, F.Y., BORONI, A.M. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain Pseudomonas fluorescens BSP53a synthetisizing an increased amount of indole-3-acetic-acid. **Soil Biological BioChemical**, 25:1277-1281. 1993.

ELAD, T. ,CHET, I., Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**, 77:190-195. 1987.

EL-TARABILY, K.A., SOLIMAN, M.H., NASSAR, A.H., AL-HASSANI, H.A., SIVASITHAMPARAM, K., MCKENNA, F., HARDY, G.E.ST.J., Biological control fo *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, 49:573-583, 2000.

ELLIS, R.J., TIMMS-WILSON, T.M., BAILEY, M.J., Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, 2:274-284, 2000.

ENEBACK, S.A., WEI, G., KLOEPPER, J.W. Effects of PGPR on loblolly and slash pine seedelings. **Forest Science**, v.44, n.1, p. 139-144. 1998.

FRAVEL. D.R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, 26:75-91, 1988.

GARBAYER, J. Helper bacteria: A new dimension to mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, 128:197-210, 1994.

GARDNER, J. M.; CHANDLER, J. L.; FELDMAN, A. W. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. **Plant and Soil**, v.77, n.1, p.103-113, 1984.

GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifyng hormonal balances in plants. **Plant Physiological Biochemica**, 32:11-28, 1994.

GAUDIN, V.; VRAIN, L. Bacterial genes modifyng hormonal balances in plants. **Plant Physiological Biochemica**, 32: 11-28, 1994.

GAIND, S., GAUR, A.C., Impact of fly ash and phosphate solubilising bacteria on soybean productivity. **Bioresource Technology**, 85: 313-315, 2002.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M. & THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 32:272-289, 1996.

GETHA, K., VIKINESWARY, S., Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28:303-310, 2002.

GOMES, F. P.; GARCIA, H.C. Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: **FEALQ**, 2002. 309 p.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology** 41: 109-117. 1995.

GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G., PENROSE, D.M. Biochemical and genetics mechanisms used by PGPR. Ontario, Canadá: **ICP**, 1999, 267p.

GUPTA, S., ARORA, D.K., SRIVASTAVA, A.K., Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, 27:1051-1058, 1995.

HALL, J.A.; PEIRSON, D.; GHOSH, S., GLICK, B.R. Root elongation in various agronomic crops by plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Journal Plant Science**, 44:37-41, 1996.

HELBIG, J., BOCHOW, H., Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry. **Journal of Plant Disease and Protection**, 108:545-559, 2001.

HAMMER, P.E.; HILL, D.S.; LAM, S.T.; VAN PÉE, K.H., LIGON, J.M. Four genes *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 2147-2154, 1997.

HUTCHINSON, C.R., FUJI, I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, 49: 210-238. 1995.

KADO, C. I., HESKETT, M.S. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinea*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Pythopathology**, v.60, p.969-976.1970.

KATSY, E.I. Participation of auxins in regulation of bacterial and plant gene expression. **Russian Journal Genetic**, 33: 463-473, 1997.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, 64: 24-30,1980.

KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N., Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, 71:1020-1024, 1981.

KLOEPPER, J.W., ZABLOTOWICZ, R.M., LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. Pp. 315-326. In: Keister, D.L. & Cregan, P.B. eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, **Academic Publishers**. 1990.

KOBY, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I., OPPENHEIM, A.B. The chitinase encoding Tn-7 based *chiA* gene endows *Pseudomonas fluorescens* with capacity to control plant pathogens in soil. **Gene**, 147:81-83, 1994.

LANDA, B.B., NAVAS-CORTÉS, J.A., HERVÁS, A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on suppression of fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. **Phytopathology**, 91:807-816, 2001.

LEONG, J. Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 24:187-209, 1986.

LEBUHN, M., HEULIN, T., HARTMAN, A., Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymixa* strains isolated from different proximity to plant roots. **FEMS Microbiology Ecology**, 22,325-334, 1997.

LIFSHITZ, R., KLOEPPER, J.W., KOZLOWSKIM, M., SIMONSON, C., CARLSON, J., TIPPING, E.M., ZALESKA, I. Growth promotion of canola seedling by a strain of *P. Putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, 85:696-698, 1995 a.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopatology**, 85:843-847. 1995 b.

LOPER, J.E., NOVAK-THOMPSON, B., WHISTLER, C.A., HAGEN, M.J., CORBELL, N.A., HENKELS, M.D., STOCKOWELI, V.O. Biological control mediated by antigungal metabolite production and resource competition: an overview. In: **Plant Growth promoting rhizobacteria: Present Status and future prospects**. (eds) OGOSHI, KOBAYASHI, HOMMA, KODANA, KONDO and AKIMO. Sapporo, Japan: OECD, p.73-79.1997

LORENZI, H. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil. Árvores Brasileiras. Nova Odessa, **Plantarum** (ed), São Paulo. P.48. 1992.

LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, 18: 82-85, 1993a.

LUZ, W.C. 1993b. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M. & PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**.

LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **RAPP**. V.4. 1996. P.1-50.

MAHAFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Applications of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In Pankhurst, C.E.; Doube, B.M.; Gupta, V.V.S.R. & Grace, P.R. (eds.). **Soil Biota: Management in Sustainable farming systems**. CSIRO Austrália. p. 23-31. 1994.

MARDUKOVA, E.A., SOKOLOV, S.L., KOCHETKOV, V.V., KOSHELEVA, I.A., ZELENKOVA, I.F., BORONIN, A.M., Involvement of naphthalene dioxygenase in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiology Letters**, 190:279-285. 2000.

MAURHOFER, M., HASE, C.; MEUWLY, P.; METRAUX, J.P., DEGAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. **Phytopathology** 84:139-146. 1994.

MAURHOFER, M.; REIMMANN, C. SACHERER, S.P. HEEB, S. HAAS, D. & DEFAGO, G. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. **Phytopathology**, 88:678-684. 1998.

MAIAK, S., TIROSH, T., GLICK, B.R. The influence of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 on the rooting of mung bean cuttings. In: INT. WORKSHOP ON PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 4., 1997. **Proceedings...**, Sapporo, Japan: OECD, p.313-315. 1997.

MENDONÇA, F. A. Preservação florestal, reflorestamento e florestamento. **Universidade Federal da Bahia**. P.9-19. 1998.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (ed). **Ecologia Microbiana. Jaguariuna**: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 86-116. 1998.

MOHAMMAD, G., PRASSAD, R. Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in polytoped *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. **J. Trop. For.**, v.4, p.74-77. 1988.

MURPHY, J.F., ZEHNDER, G.W., SCHUSTER, D.J., SIKORA, E.J., POLSTON, J.E., KLOEPPER, J.W., Plant growth-promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. **Plant Disease**, 84:779-784, 2000.

NARDI, S., SESSI, E., PIZZEGHELLO, D., STURARO, A., RELLA, R., PARVOLI, G., Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. **Chemosphere**, 46:1075-1081, 2002.

NASEBY, D.C., WAY, J.A., BAINTON, N.J., LYNCH, J.M., Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. **Journal of Applied Microbiology**, 90:421-429, 2001.

NELSON, E.B. Bacterial metabolism of propagule germination stimulants as an important trait in the biocontrol of *Pythium* seed infections. In: TJAMOS, E.C.; PAPAVIDAS, G.C. & COOK, R.J. (Ed). Biological Control of plants diseases: Progress and challenges for the future. New York, **Plenum Publishing Company**, p. 327-325.1992.

NEVES, I.F., ZARPELON, T.G., MAFIA, R.G., NASCIMENTO, E.M., GARNICA, A.D., FRANCO, L.G., FARIA, A., ALFENAS, A.C. Rizobactérias como promotoras do crescimento de espécies arbóreas ornamentais. XIV Smpósio de Iniciação científica. **Anais...** Viçosa. P.153. 2004.

PAIVA, A.N., GOMES, J.M. Viveiros Florestais. Caderno didático 72. **Editora UFV**. Ed. 2. Universidade Federal de Viçosa, MG, 2000. 7-53 p.

PAIVA, A.N., GONÇALVES, W. Florestas Urbanas. Viçosa-MG. **Aprenda Fácil** (ed). P. 24-26. 2002.

PAL., K.K., TILAK, K.V.B.R., SAXENA, A.K., DEY, R., SINGH, C.S., Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, 155:233-242, 2000.

PAL, K.K., TILAK, K.V.B.R., SAXENA, A.K., DEY, R., SINGH, C.S., Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, 156:209-223, 2001.

PAULITZ, T.C. & BACKER, R. Control of *Pythium* damping-off of cucumber with *Pythium* nunn: influence os soil environmetal and organic amendments. **Phytopathology**, 77:341-346. 1987

RAJ, J., BAGYARAJ, D.J., MANJUNATH, A. Influence of soil inoculation whit vesicular arbuscular micorhiza and a phosphate dissoving bacterium on plant growth and P-uptake. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p. 105-108. 1981

ROCHA, M.G.B. Melhoramento de Espécies Arbóreas Nativas. **IEF/MG (Instituto Estadual de Floresta – MG, 2002. 173P.**

SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Ann. Rev. Microbiol.** 35: 453-476. 1981.

SCHROTH, M.N., HANCOCK, J. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376.1982.

SCHROTH, M.N. & WEINHOLD, A.R. Root-colonizing bacteria and plant health. **Hort Science** 21 (6): 1295-1302. 1986.

SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., VAN PEER, R. Beneficial and deleterious and beneficial rhizosphere microorganims and the effect og cropping practices. **Annual Review of Phytophatology**. V.5, p.339-358. 1987.

SHISHIDO, M.; PETERSON, D.J.; MASSICOTTE, H.B.,CHANWAY, C.P. Pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection after inoculation with plant growth promoting *Pseudomonas* strains. **FEMS. Microbiology Ecology**, 21:109-119. 1996.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil Tillage Research**, 72:107-123, 2003.

SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medicine Faculteit Landbouwwetenschappelijke Rijksuniversiteit Gent** 53(2b): 867-878. 1988.

SILVA FILHO, G.N., VIDOR, C., Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 24:311-319, 2000.

SILVA FILHO, G.N., VIDOR, C., Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, G.N., NARLOCH, C., SCHARF, R., Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:847-854, 2002.

SUSLOW, T.V., SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacterias as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, 72: 111-115. 1982.

TEIXEIRA, D.A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem à mancha de *Cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp.. **Tese**. Viçosa-MG: UFV. p.5-42. 2001.

THRANE, C., NIELSEN, M.N., SORENSEN, J., OLSSON, S., *Pseudomonas fluorescens* DR54 reduces sclerotia formation, biomass development, and disease incidence of *Rhizoctonia solani* causing damping-off in sugar beet. **Microbial Ecology**, 42:438-445, 2001.

TIMMUSK, S., NICANDER, B., GRANHALL, U., TILLBERG, E., Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, 31:1847-1852, 1999.

TURNER, J.T., BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, v.75, p.347-353. 1991.

WEI, L.; KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**. 86: 221-224. 1996

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 26:379-407. 1988.

YANG, T.; LAW, D.M., DAVIES, P.J. Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light grown pea seedling. **Plant Physiology**, 102:717-724. 1993.

YU., G.Y., SINCLAIR, J.B., HARTMAN, G.L., BERTAGNOLLI, B.L., Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, 34:955-963, 2002.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36:453-483. 1998.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; YAO, C, WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth promoting rhizobacteria. **Journal Econ. Entomology**, 90:391-396. 1997.

7- APÊNDICE

QUADRO 1- Análise de variância múltipla para o ensaio 2

Sem testemunha					
	Valor do Teste	Soma do quadrado	Grau de liberdade dos efeitos	Grau de liberdade do erro	Probabilidade
Intercepto da curva de distribuição F	0,002906	3859,744	4	45,0000	0,000000
Formulação	0,802059	1,312	8	90,0000	0,247873
Isolado	0,783771	0,959	12	119,3503	0,491369
Formulação * Isolado	0,573761	1,138	24	158,1963	0,309223
Com testemunha					
Intercepto da curva de distribuição F	0,002755	4433,765	4	49,0000	0,000000
Formulação	0,804495	1,408	8	98,0000	0,202826
Isolado	0,786870	1,027	12	129,9333	0,428415
Formulação * Isolado	0,579251	1,215	24	172,1506	0,234634

QUADRO 2- Análise de variância múltipla para o ensaio 3

Com testemunha					
	Valor do Teste	Soma do quadrado	Grau de liberdade dos efeitos	Grau de liberdade do erro	Probabilidade
Intercepto da curva de distribuição F	0,000110	111853,2	4	49,0000	0,000000
Formulação	0,151924	19,2	8	98,0000	0,000000
Isolado	0,336652	5,5	12	129,9333	0,000000
Formulação * Isolado	0,033591	11,8	24	172,1506	0,000000
Sem testemunha					
Intercepto da curva de distribuição F	0,000093	120798,2	4	45,0000	0,000000
Formulação	0,125766	20,5	8	90,0000	0,000000
Isolado	0,302047	5,7	12	119,3503	0,000000
Formulação * Isolado	0,027472	11,9	24	158,1963	0,000000