

DÉBORA DO AMARAL TEIXEIRA

**PROMOÇÃO DE ENRAIZAMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA
SISTÊMICA À FERRUGEM E À MANCHA-DE-CYLINDROCLADIUM,
MEDIADAS POR RIZOBACTÉRIAS EM CLONES DE *Eucalyptus* spp.
(Patente PI 0101400-5)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2001

DÉBORA DO AMARAL TEIXEIRA

**PROMOÇÃO DE ENRAIZAMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA
SISTÊMICA Á FERRUGEM E Á MANCHA-DE-CYLINDROCLADIUM,
MEDIADAS POR RIZOBACTÉRIAS EM CLONES DE *Eucalyptus* spp.
(Patente PI 0101400-5)**

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

APROVADO: 20 de dezembro de 2001

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Conselheiro)

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Prof. Eduardo S. G. Mizubuti

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, Aristides e Graça, pelo amor e apoio em todos os momentos;

Às minhas irmãs, pelas lindas Marina, Amanda, Bárbara, Laura e Leticia, alegrias de nossa casa;

Aos amigos mais queridos, sem eles tudo teria sido bem mais difícil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela chance de crescimento que me deu;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia por fornecerem a base para meu desenvolvimento profissional;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

Às empresas florestais que sempre me receberam de portas abertas, dando todas as condições para realização deste trabalho.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, pela orientação, pelos entendimentos e desentendimentos, que muito contribuíram para meu amadurecimento pessoal e profissional;

Ao Prof. Luiz Antônio Maffia, muito mais que um conselheiro, pela presteza em ajudar sempre;

Aos Professores Reginaldo da Silva Romeiro, Eduardo S.G. Mizubuti, Silvaldo da Silveira, Sérgio Brommonschenkel, pelas críticas e sugestões;

Ao Prof. Demuner e ao Departamento de Química, pelo auxílio;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela paciência e atenção;

Aos motoristas da UFV que muitas vezes deixaram o volante para me auxiliarem na montagem e coleta de experimentos;

Aos amigos de curso, por compartilharem conhecimentos, alegrias e tristezas;

Aos colegas de laboratório, Edival, Renildo, Sandra, Eugênio, Riva, Reginaldo, Eraclides, Rogério, Márcia, pelo convívio agradável e pela ajuda em vários momentos;

Às “irmãs” Adelica, Adriana e Andrea, pela amizade, companheirismo e pela certeza de que quem tem um amigo nunca está sozinho;

Aos grandes amigos José Mauro, Ailton, Tutu, Edson, João, Rosângela, Regina, Alessandra, Cláudia, Gisele, Renato, Marcus, Márcia, Claudine, Micheline, Cecília e tantos outros, não menos queridos, por fazerem essa caminhada mais agradável;

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DÉBORA DO AMARAL TEIXEIRA , filha de Aristides Santos Teixeira e Maria da Graça Amaral Teixeira, nasceu em 9 de abril de 1970 em Almenara, Minas Gerais.

Concluiu o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em 1994. Em 1996, graduou-se também em Engenharia Florestal, na mesma instituição.

Em março de 1996, ingressou no curso de Mestrado em Fitopatologia na UFV, transferindo-se para o doutorado na mesma área em 1997, sem defesa de tese.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS: Mecanismos de ação e seu potencial de utilização em essências florestais	4
2.1. Mecanismos indiretos de promoção de crescimento	6
2.1.1. Supressão de microrganismos deletérios e/ou patogênicos.....	6
2.1.1.1. Competição	7
2.1.1.2. Antibiose.....	8
2.1.1.3. Parasitismo	9
2.1.1.4. Produção de compostos voláteis tóxicos.....	10
2.1.1.5. Indução de resistência sistêmica	10
2.1.2. Promoção de associações simbióticas	11
2.2. Mecanismos diretos de promoção de crescimento.....	12
2.2.1. Produção de fitohormônios.....	12
2.2.2. Síntese de ACC deaminase: inibição de etileno	13
2.2.3. Aumento da disponibilidade de nutrientes na rizosfera	14
2.3. Utilização de rizobactérias promotoras de crescimento como alternativa para produção de essências florestais	15
Capítulo 1	
PROMOÇÃO DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus</i> spp. MEDIADA POR RIZOBACTÉRIAS	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1.Obtenção dos isolados de rizobactérias	19
2.2.Testes de seleção.....	20
2.3. Identificação dos isolados	20
2.4.Eficácia dos isolados em diferentes substratos de enraizamento	21

2.5. Eficácia dos isolados em diferentes clones de eucalipto.....	21
2.6. Produção de AIA (ácido indol acético) em meio líquido	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Obtenção dos isolados de rizobactérias	23
3.2. Testes de seleção	23
3.3 Identificação dos isolados	26
3.4. Eficácia dos isolados em diferentes substratos de enraizamento	26
3.5.Eficácia dos isolados em diferentes clones de eucalipto.....	29
3.6. Produção de AIA (ácido indol acético) em meio líquido	34
4. DISCUSSÃO	35
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	40
Capítulo.2	
RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA POR RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM <i>Eucalyptus</i> spp. À FERRUGEM (<i>Puccinia psidii</i>) E À MANCHA-DE-CYLINDROCLADIUM.....	42
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1.Indução de resistência à ferrugem (<i>Puccinia psidii</i>).....	44
2.2.Efeito do tempo decorrente entre tratamento com rizobactéria e inoculação do patógeno na indução de resistência	46
2.3.Indução de resistência à mancha de <i>Cylindrocladium candelabrum</i>	46
3. RESULTADOS.....	47
3.1.Indução de resistência à ferrugem (<i>Puccinia psidii</i>)	47
3.2.Efeito do tempo decorrente entre tratamento com rizobactéria e inoculação do patógeno na indução de resistência.....	52
3.3.Indução de resistência à mancha de <i>C. candelabrum</i>	53
4. DISCUSSÃO	54
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	57
3. CONCLUSÕES GERAIS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

TEIXEIRA, Débora do Amaral. Universidade Federal de Viçosa, DS, Dezembro de 2001. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp. (Patente PI0101400-5)**. Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e Reginaldo da Silva Romeiro.

A propagação vegetativa de eucalipto por meio da técnica de miniestaquia vem sendo amplamente empregada nas principais empresas florestais do país. No entanto, ainda se verifica heterogeneidade quanto ao enraizamento entre os genótipos, principalmente na fase inicial de adaptação dos clones. Deste modo, técnicas alternativas que otimizem o enraizamento de estacas e miniestacas de eucalipto são fundamentais para melhorar a qualidade das mudas e reduzir o custo de produção. Além de potencialmente poderem atuar como promotoras de enraizamento, a utilização de rizobactérias na multiplicação clonal de eucalipto, pode propiciar a obtenção de mudas com maior resistência às doenças associadas a viveiros de propagação. Testaram-se 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, quanto ao seu potencial como promotores de enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp. Para tanto, amostras de substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada:vermiculita (1:1) foram tratados com 10 ml de uma suspensão de

cada isolado ($OD_{540} = 0,2A$)/tubete, correspondendo à cerca de 10^8 ufc/ml. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, cada uma delas constituídas por 10 estacas. Aos 30 dias, avaliou-se o enraizamento médio (porcentagem média de estacas enraizadas) e o peso médio do sistema radicular seco. Dez isolados destacaram-se como excelentes indutores de enraizamento, propiciando ganhos de até 110% no enraizamento médio e de até 250% no peso de raiz. Esses isolados também foram eficientes no enraizamento de miniestacas, cujos ganhos variaram de acordo com o clone e isolado testados. Também se avaliou o efeito dos 10 isolados como promotores de enraizamento em três diferentes substratos: vermiculita pura; moinha de carvão:composto de casca de eucalipto:vermiculita (5:3:2) e composto de casca de arroz carbonizada:vermiculita (1:1). Não se observou interação isolado-substrato, sendo que o substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada foi muito superior, quanto à porcentagem de miniestacas enraizadas e ao peso médio de raiz seca. Mudanças com cerca de 80 dias de idade, previamente enraizadas em substrato tratado com as rizobactérias, foram testadas quanto à resistência à ferrugem do eucalipto e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum*, em câmaras de crescimento ($22^{\circ} C$ / fotoperíodo = 12 h). Utilizou-se um DIC com quatro repetições, cada uma com três plantas, para ferrugem, e quatro tratamentos com cinco repetições para *Cylindrocladium*. Aos 13 dias da inoculação, avaliaram-se o número médio de pústulas/ folha, número de soros/ amostra e o número médio de esporos/ soro. Na avaliação da mancha de *Cylindrocladium candelabrum*, mediu-se apenas o tamanho da lesão ao oitavo dia após a inoculação, visto a mesma ter sido feita utilizando-se discos de micélio. Dois isolados foram bastante eficientes na redução da severidade da ferrugem, no entanto, o mesmo efeito não foi observado para *Cylindrocladium*. Com o tratamento das mudas com rizobactérias apenas uma semana antes da inoculação com *Puccinia psidii*, obteve-se redução na severidade da doença muito menor do que a observada nas mudas enraizadas em substrato tratado com bactérias. Os maiores ganhos obtidos no enraizamento de miniestacas (20-40%) são bem expressivos, visto que a técnica de miniestaquia propiciou um ganho de no máximo 40% de enraizamento em relação à estaquia convencional e, no caso do tratamento com rizobactérias, não seria necessário

nenhum ajuste no manejo ou na infra-estrutura dos viveiros. Somando-se a esse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física desses viveiros, ao se diminuir o tempo que as miniestacas necessitem permanecer em casa-de-vegetação para um bom enraizamento. Os isolados selecionados foram eficientes em várias condições e em diferentes genótipos o que viabiliza a sua utilização em larga escala. Estudos de formulação ainda são necessários, de preferência empregando-se a própria fração orgânica utilizada no preparo dos substratos de enraizamento como veículo. Além disso, o conhecimento dos mecanismos de atuação podem ajudar a potencializar a promoção de crescimento, otimizando a aplicação prática dos isolados em condições de campo. Abre-se aqui um vasto campo de estudo visando aproveitar ao máximo o potencial de rizobactérias na eucaliptocultura.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Débora do Amaral. Universidade Federal de Viçosa, December 2001. **Rhizobacteria mediated rooting promotion and induction of systemic resistance to rust and *Cylindrocladium* leaf spot in *Eucalyptus* spp. clones (Patent PI0101400-5)**. Advisor: Acelino Couto Alfenas. Committee Members: Luiz Antônio Maffia and Reginaldo da Silva Romeiro.

The major afforestation companies of this country are increasingly using mini-cutting technique for vegetative propagation of eucalyptus. However, there is high heterogeneity in rooting among the genotypes, especially at the initial clone adaptation phase. Thus, alternative techniques, which can optimize the rooting of the cuttings and the mini-cuttings of eucalyptus, are essential for improving the seedling quality and reducing the production cost. Rhizobacteria potentially can act as rooting promoters for clonal multiplication of eucalyptus, and can also help obtain seedlings with greater resistance to nursery diseases. One hundred and seven bacteria obtained from the rhizosphere of seedlings of different eucalyptus clones, were tested for their potential as rooting-promoters of cuttings and mini-cuttings. Substrate based on the compost of carbonized rice hull: vermiculite (1:1) was treated with 10 ml of the bacterial suspension ($OD_{540} = 0.2$ $A=10^8$ cfu/ml) / tube of either isolate. Completely randomized block design was used with five replications of 10 cuttings each, and mean rooting percentage dry root weight was determined 30 days after

planting. Ten isolates were found to be excellent root inducers, increasing rooting percentage by about 110% and root dry weight by 250% relative to controls. These isolates were also efficient in promoting the rooting of mini-cuttings and the beneficial effect varied among the clones and the isolates. The root inducing effect of these isolates was further tested in three different substrates: pure vermiculite; ground charcoal; eucalyptus bark compost: vermiculite (5:3:2) and compost of carbonized rice hull: vermiculite (1:1). There was no isolate-substrate interaction, but the carbonized rice hull: vermiculite substrate was much superior for improving percentage rooting of mini-cuttings and dry root weight. Eighty days old seedlings previously rooted in the rhizobacteria treated substrate were tested for resistance to rust and leaf spot caused by *Cylindrocladium candelabrum*, in a growth room (22°C/ 12 h photoperiod). Completely randomized block design with four replications of three plants each was used for rust, and four treatments with five replications were used for evaluating *Cylindrocladium*. Mean pustules number /leaf, number of sori/sample and the mean spore number /sorus was determined 13 days after inoculation. *C. candelabrum* leaf spot was evaluated by measuring mean lesion size eight days after inoculation with a mycelial disc. Two isolates were very efficient in reducing the rust severity, but not *Cylindrocladium* leaf spot. The disease severity reduction was much less in seedlings treated with the rhizobacteria only week before the inoculation with *Puccinia psidii*, compared to seedlings rooted in the treated substrate. The maximum benefit in the rooting of mini-cuttings (20 to 40%), is expressive, considering that the mini-cutting technique gave only 40% increase in rooting over traditional cuttings. Use of treatment with rhizobacteria, does not require management adjustment or the infrastructure changes of the nurseries. Adding to this direct advantage, there is better use of the physical space of the nursery, because the time required for mini-cuttings to stay in the greenhouse is drastically reduced. The selected isolates were efficient under different conditions and on different genotypes, which makes its large-scale use possible. Studies on the formulation are necessary, preferentially using the same organic fraction used for preparing the rooting substrate as vehicle. Besides this the knowledge of the mode of mechanism can help optimize growth promotion, by optimizing the application

practice of the isolates in field conditions. A wide field of study is opened for using maximally the potential of rhizobacteria in eucalyptus cultivation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a essência florestal mais plantada no Brasil, abrangendo uma área de cerca de 3 milhões de ha. As diferentes espécies plantadas apresentam uma grande variabilidade intra e interespecífica com relação a várias características silviculturais de interesse econômico, tais como produção de biomassa, taxa de crescimento, resistência a doenças, a pragas, a geadas e ao déficit hídrico, entre outros (CHAPERON, 1987). A produção de mudas via propagação vegetativa têm sido utilizada com o objetivo de aumentar a produtividade dessa cultura e evitar a variabilidade encontrada em plantios obtidos a partir de plantios seminais. A estaquia comercial de *Eucalyptus* iniciou-se na República Popular do Congo (África), em 1975, onde foram implantados 3000 ha com mudas clonais (DEWAULLE, 1983). No Brasil, o uso dessa técnica em grande escala, iniciou-se em 1979, no Espírito Santo (CAMPINHOS e IKEMORI, 1983). Inicialmente, as brotações eram coletadas no campo, após o corte das árvores matrizes, posteriormente, evoluindo posteriormente para o sistema de manejo em jardim clonal, local específico para produção e coleta de brotos, buscando-se um melhor controle sobre a quantidade e qualidade dos mesmos.

O processo de clonagem por estaquia representou um grande avanço na eucaliptocultura brasileira, permitindo a fixação de características genéticas pouco herdáveis, como incremento em volume e rendimento de celulose, e a obtenção de plantios mais homogêneos e produtivos. Mesmo com utilização da

estaquia ainda se observam grandes variações na capacidade de enraizamento entre espécies de eucalipto e materiais híbridos (PENCHEL *et al.*, 1995). Além disso, pode ocorrer a redução gradual do potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogênico das matrizes (ASSIS, 1997). Visando minimizar os problemas advindos da técnica de estaquia convencional, ASSIS *et al.* (1992) desenvolveram a técnica de microestaquia, que baseia-se no aproveitamento do alto grau de rejuvenescimento de plantas micropropagadas *in vitro*, utilizadas para obtenção de minimatrizes para coleta de brotos. Tendo em vista o alto custo para estabelecimento e manutenção de um laboratório de micropropagação, os mesmos autores (ASSIS *et al.*, 1992), desenvolveram a técnica de miniestaquia, que consiste na utilização de brotações novas coletadas em mudas propagadas vegetativamente e conduzidas em minijardim clonal. Essas novas técnicas possibilitaram grandes vantagens operacionais e econômicas em relação à estaquia tradicional (macroestaquia), tais como: aumentos do rendimento operacional e do percentual de enraizamento e qualidade das mudas, diminuição no tempo de enraizamento, aumento da eficiência na utilização das casas-de-vegetação, redução do tempo de predisposição das estacas aos fungos apodrecedores, diminuição do uso de hormônios de enraizamento e eliminação do jardim clonal no chão, dentre outras (ASSIS, 1997).

Atualmente, a miniestaquia vem sendo amplamente usada nas principais empresas florestais do país, na maioria das vezes sem a necessidade do rejuvenescimento inicial *in vitro*. No entanto, ainda se verifica heterogeneidade quanto ao enraizamento entre os genótipos, principalmente na fase inicial de adaptação dos clones. Deste modo, técnicas alternativas que otimizem o enraizamento de estacas e miniestacas de eucalipto são fundamentais para melhorar a qualidade das mudas e reduzir o custo de produção. Vários autores relatam como efeito da utilização de rizobactérias promotoras de crescimento um maior desenvolvimento do sistema radicular (BROWN *et al.*, 1974; LIFSHITIZ *et al.*, 1987; CARLETTI *et al.*, 1994). Há, contudo, poucos estudos sobre a influência desses organismos no enraizamento de estacas. MAYAK *et al.* (1997, 1999) observaram uma maior produção de raízes em estacas de *Vigna radiata*, induzida por um isolado de *Pseudomonas putida*. Em essências florestais, o efeito promotor de crescimento de rizobactérias foi bem relatado,

principalmente em gimnospermas (*Pinus*, *Picea*, *Tsuga* e *Pseudotsuga*), em mudas oriundas de sementes ou propagadas *in vitro* (CHANWAY, 1997; ENEBACK *et al.*, 1998), mas nenhum trabalho encontrado relata a utilização das mesmas no enraizamento de estacas dessas espécies. Além de potencialmente promoverem o crescimento de plantas, a utilização de rizobactérias na multiplicação clonal de eucalipto, poderia propiciar a obtenção de mudas com maior resistência à doenças associadas a viveiros de propagação, como já relatado para diferentes tipos de patógenos em várias culturas (VAN LOON *et al.*, 1998). Vários patógenos são comuns em minicepas de eucalipto, destacando-se *Puccinia psidii*, fungo biotrófico causador da ferrugem do eucalipto, que só se desenvolve bem em material juvenil, freqüentemente encontrado nesse sistema de produção de mudas. Destacam-se também espécies de *Cylindrocladium* causadoras de manchas foliares, que, ao serem levadas nas brotações para dentro das casas de enraizamento, podem causar podridão de estacas.

Desta forma, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência de isolados de rizobactérias sobre o enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* e na indução de resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha-de-Cylindrocladium, doenças foliares freqüentemente encontradas em minicepas de eucalipto, doadoras de propágulos para enraizamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS: Mecanismos de ação e seu potencial de utilização em essências florestais

A rizosfera, zona de influência do sistema radicular, constitui um microecossistema especializado e dinâmico decorrente da grande quantidade e diversidade de compostos depositados pelas raízes das plantas nesta região (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). Esse microecossistema favorece o crescimento de uma diversidade de microrganismos que se beneficiam do suprimento constante de substratos orgânicos e fatores de crescimento essenciais. O chamado efeito rizosférico propicia a ocorrência de uma população microbiana até cem vezes maior que a encontrada no solo adjacente (SIQUEIRA, 1993). Embora esse efeito não seja específico, bactérias, em especial as gram negativas, são os organismos mais abundantes porque crescem rapidamente, são resistentes a vários antibióticos e são capazes de utilizar uma ampla classe de substâncias como fonte de carbono e nitrogênio (GLICK, 1995).

A interação entre microrganismos rizosféricos e raízes pode ser benéfica, neutra ou prejudicial à planta, e pode variar de acordo com as condições do solo (DIGAT *et al.*, 1993; GLICK, 1995). O termo rizobactérias foi usado para denominar as bactérias que colonizam o sistema radicular (SCHROTH e HANCOCK, 1982). Rizobactérias benéficas (RBBs) são

encontradas na rizosfera de diversas culturas e 2 a 5 % dos isolados dessas podem apresentar um efeito positivo no crescimento de plantas (SCHROTH e HANCOCK, 1981). KLOEPPER e SCHROTH (1978) introduziram o termo "plant growth promoting rhizobacteria" (PGPR's), rizobactérias promotoras de crescimento das plantas, para designar um subgrupo de rizobactérias benéficas que induzem maior crescimento e/ou produtividade em plantas. Essa definição não requer que o controle biológico seja o determinante da estimulação do crescimento.

Fertilizantes bacterianos não simbiotes (*Azobacter* e *Bacillus*) foram primeiramente empregados no final do século XIX (1885) na antiga União Soviética. Nesse mesmo país, em 1958 foram utilizados em cerca de 10⁷ ha de 50-70% das principais culturas e propiciaram um incremento de 10-20% da produtividade das mesmas (BROWN, 1974). No entanto, somente a partir do final da década de 70 é que surgiram trabalhos que demonstram, de forma consistente, o papel das PGPR's e procuram elucidar os mecanismos que permitem a esses microrganismos atuarem como promotores de crescimento (BURR *et al.*, 1978; KLOEPPER e SCHROTH, 1978; KLOEPPER *et al.*, 1980; CHEN *et al.*, 1996). Dentre as PGPR's, destacam-se as dos gêneros *Pseudomonas*, principalmente do grupo fluorescente, *Bacillus* e actinomicetos do gênero *Streptomyces*; embora outros gêneros de bactérias sejam citados (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Erwinia*) (MAHAFFEE e KLOEPPER, 1994; DIGAT *et al.*, 1993; LUZ, 1996).

Os principais efeitos das PGPR's são o crescimento de raízes, crescimento de parte aérea e aumento do rendimento da planta.

No mercado norte-americano já existem formulações 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). Kodiak é compatível com vários fungicidas, p. ex. metalaxyl, thiram, carboxin, captan e PCNB. Essa possibilidade de combinação do produto biológico com o químico possibilita o uso conjunto de produtos químicos e biológicos em um programa de manejo integrado, permitindo reduzir a quantidade de defensivos químicos utilizada e os problemas com o surgimento de isolados de patógeno resistentes a fungicidas.

Embora na área agronômica o interesse pelas PGPR's venha aumentando significativamente nas últimas décadas, na área florestal relativamente pouco se sabe sobre o comportamento desses organismos.

2.1. Mecanismos indiretos de promoção de crescimento

Nesse caso, as rizobactérias atuam como agentes de biocontrole, suprimindo organismos deletérios ou patogênicos às plantas, ou beneficiando organismos benéficos às mesmas.

2.1.1. 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 patogênicos. 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 negativa ou positiva de auxinas, etileno, citocininas, vitaminas e outras substâncias relacionadas ao crescimento de plantas produzidas na rizosfera vai depender de suas concentrações total e relativa.

A atuação das PGPR's como agentes de biocontrole favorece indiretamente o desenvolvimento da planta hospedeira. Os principais mecanismos envolvidos nesse controle são competição, antibiose, parasitismo, produção de compostos voláteis tóxicos e indução de resistência. DOWLING e O' GARA (1994) determinaram cinco critérios que podem ser usados para determinar o envolvimento direto de um composto específico produzido por um organismo no biocontrole de fitopatógenos: mutantes negativos para produção

do composto perdem a capacidade de biocontrole em laboratório; a eficiência de biocontrole desse mutante defectivo é reduzida no campo; a complementação do mutante com seqüências de DNA do isolado selvagem restaura essa eficiência; o metabólico purificado possui propriedades antimicrobianas; e por fim, o composto pode ser detectado *in situ*, quando os isolados produtores estão presentes.

2.1.1.1. Competição

Organismos que convivem em um mesmo habitat, nesse caso a rizosfera, competem principalmente por nutrientes e espaço. Essa competição pode, em casos mais drásticos, levar até a exclusão de um organismo de um determinado nicho. PAULITZ e BAKER (1987) citam que nitrogênio, carbono e ferro são elementos essenciais para desenvolvimento da maioria dos fitopatógenos. A competição por ferro merece um destaque especial no caso de algumas PGPR's, envolvendo a participação de compostos especiais denominados de sideróforos. Sideróforos são pequenos quelantes de Fe^{3+} de baixo peso molecular (500-1000 daltons), 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). A biossíntese de sideróforos em bactérias gram-negativas e outros microrganismos é controlada pelo Fe-operon presente no cromossoma ou em plasmídeos bacterianos. No Fe-operon estão presentes genes que codificam para a produção de enzimas envolvidas na síntese de sideróforos e outros que codificam para a produção de proteínas receptoras. MOORES *et al.* (1984) citam que pelo menos doze genes arranjados em "clusters" estão envolvidos na biosíntese de sideróforos. Esse sistema de biosíntese de sideróforos e proteínas receptoras é ativado em condições de ferro limitante e reprimido quando a concentração de ferro no ambiente circundante se torna maior (LEONG, 1986). DOWLING e O'GARA (1994) relatam que a inibição da síntese de sideróforo é mediada por um repressor **Fur** (ferric-uptake regulator) tendo o Fe^{2+} como co-fator, e ativada pelo promotor **pbrA** que induz a síntese de **pbsC** e de **pbvA**, promotores da síntese

de sideróforo e da proteína receptora, respectivamente. Proteínas da parede externa, da membrana plasmática e do espaço periplásmico (proteínas periplásmicas) estão envolvidas nesse processo de absorção de Fe via sideróforos (LEONG, 1986).

No interior da célula, o ferro é liberado do complexo **Fe³⁺-sideróforo** provavelmente por redução visto que os sideróforos possuem baixa afinidade por Fe²⁺ (O'SULLIVAN *et al.*, 1990). Após liberado o ferro pode finalmente ser incorporado aos componentes celulares que possuem esse elemento em sua estrutura.

Segundo WELLER (1988), fitopatógenos são suprimidos em ambiente com PGPR's produtoras de sideróforos por várias razões: (a) microrganismos patogênicos não produzem seus próprios sideróforos; (b) são incapazes de utilizar os sideróforos produzidos pelos outros microrganismos do meio; (c) esses fitopatógenos produzem sideróforos com menor afinidade para o Fe³⁺ que os produzidos pelos antagonistas. Assim as rizobactérias benéficas possuem maior poder de competição em solos com baixa concentração de ferro, ou seja, solos com pH neutro a alcalino, quando produzem sideróforos com alta afinidade para complexar o Fe³⁺ e/ou possuem proteínas receptoras extras que lhes permitam absorver os **complexos Fe³⁺-sideróforo** de outros microrganismos do meio, se tornando desta forma muito mais eficientes na absorção de ferro e limitando o crescimento de outros microrganismos que também necessitam desse micronutriente para seu desenvolvimento.

2.1.1.2. Antibiose

Antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular e de grande diversidade química produzidos por microrganismos e que, em baixas concentrações, atuam como deletérios ao metabolismo de outros organismos (FRAVEL, 1988).

Durante muitos anos, antibiose foi o mecanismo de biocontrole mais estudado devido a facilidade de seu estudo *in vitro*. No entanto, a determinação do papel real desse mecanismo *in situ* se mostra bem mais complexo, sendo sua atuação desuniforme no tempo e espaço e ocorrendo

somente em microhabitats onde os fatores ambientais favoreçam a ativação e expressão dos genes envolvidos em sua síntese (LOPER *et al.*, 1997). Atualmente esses estudos são facilitados pela utilização de mutantes negativos para a produção de determinado antibiótico.

Mesmo quando esse mecanismo não é o principal responsável pelo biocontrole, a capacidade de produzir antibióticos pode propiciar uma maior capacidade competitiva a isolados promotores de crescimento na rizosfera, aumentando sua sobrevivência e colonização do sistema radicular.

Uma infinidade de antibióticos produzidos por bactérias são bem conhecidos como a agrocina 84, oomicinas, fenazinas, pioluterinas e pirrolnitrinas. 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), no entanto há regulações mais complexas envolvendo um grande número de genes, como em *Streptomyces* spp. (HUTCHINSON e FUJII, 1995).

A seqüência genética de genes envolvidos na produção de vários antibióticos já são bem conhecidas, como prnA, prnB, prnC e prnD, envolvidos na produção de pirrolnitrina em *P. fluorescens* BL915 (HAMMER *et al.*, 1997).

2.1.1.3. Parasitismo

Muitos isolados de rizobactérias produzem enzimas capazes de lizar células fúngicas, como por exemplo quitinases, envolvidas na degradação da quitina, principal componente da parede celular desse grupo de organismos, glucanases, proteases e lípases (CHET e INBAR, 1994). 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 eficiência de biocontrole (KOBAYASHI *et al.*, 1994).

2.1.1.4. 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, inibindo o crescimento de vários organismos, como 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 determinado para batata (SHIPPERS *et al.*, 1991). No entanto, outros trabalhos mostram o papel desse composto na promoção do desenvolvimento de pêlos radiculares (LUZ, 1996).

2.1.1.5. Indução de resistência sistêmica

Os mecanismos de defesa nas plantas podem ser ativados por um estímulo apropriado. Essa indução de resistência ocorre de forma natural, particularmente quando se observam reações de hipersensibilidade, e pode ser ativada por produtos químicos, organismos não patogênicos, formas avirulentas ou raças incompatíveis de um patógeno, ou por patógenos virulentos (VAN LOON *et al.*, 1998). Geralmente, essa indução de resistência é sistêmica e seu efeito pode ser observado em locais da planta distantes do local de aplicação do indutor. No entanto, às vezes ocorre somente de forma localizada. Esse mecanismo é denominado de resistência sistêmica adquirida (SAR) caracterizado pelo acúmulo de ácido salicílico (SA) e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (VAN LOON *et al.*, 1998).

O termo resistência sistêmica induzida (ISR) foi sugerido por KLOEPPER *et al.* (1992) para casos em que a resistência é especificamente induzida por microrganismos não patogênicos, embora fenotipicamente o fenômeno seja similar a SAR. Ao contrário do observado para SAS, na ISR não se observa o acúmulo de proteínas PRs, a indução não é dependente de salicilato e nem se observam alterações visuais como necrose na planta induzida. Entretanto, já existe relatos que mostram que a ISR em alguns casos

podem ser não só fenotipicamente mas também mecanicamente idêntica a SAS, levando a um acúmulo de proteínas PRs e salicilato dependente (VAN LOON *et al.*, 1997).

Segundo STEINER e SCHONBECK (1995), alguns critérios devem ser observados para se determinar o envolvimento de resistência sistêmica: 1- Ausência de efeitos tóxicos diretos do organismo de biocontrole sobre o patógeno; 2- A ISR pode ser inibida por uma aplicação prévia de inibidores específicos da expressão gênica na planta; 3- Necessidade de um intervalo de tempo para a planta expressar essa resistência; 4- Ausência da relação entre resistência e quantidade crescente de indutor; 5- Amplo espectro de atuação contra vários patógenos (inespecificidade da proteção); 6- Ocorrer local e sistemicamente; 7- dependente do genótipo da planta e seu nível de resistência.

Os principais determinantes bacterianos de ISA que podem funcionar como elicitores são os lipopolissacarídeos presentes na membrana (LPS), sideróforos e ácido salicílico (VAN LOON *et al.*, 1998).

2.1.2. 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. Uma denominação especial, “mycorrhization helper bacteria” (MHB), foi dada as bactérias capazes de colonizar o sistema radicular micorrizado e sua área de influência (micorizosfera), propiciando um aumento da micorrização (GARBAYER, 1994). SHISHIDO *et al.* (1996) sugerem que alguns isolados de *Pseudomonas* promotores de crescimento em coníferas (*Pinus contorta* e um híbrido de *Picea glauca x engelmannii*) podem especificamente estimular performance de plântulas micorrizadas no campo por um mecanismo mais complexo do que um simples aumento da infecção fúngica

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 na aumento da nodulação de rizóbios em leguminosas por PGPR's (MAHAFFEE e KLOPPER, 1994).

2.2. Mecanismos diretos de promoção de crescimento

2.2.1. Produção de fitohormônios

Muitos microrganismos que interagem com plantas possuem a capacidade de sintetizar hormônios semelhantes aos produzidos por elas para regulação de crescimento. Várias rizobactérias são capazes de sintetizar alguns fitohormônios e seus análogos, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (MELO, 1998). Dentre esses se destaca a síntese de auxinas, hormônio já bem conhecido pela sua importância nos processos de iniciação de raízes laterais e adventícias (GASPAR *et al.*, 1996) bem como alongação radicular (YANG *et al.*, 1993), dentre outros. Dois efeitos relacionados à auxina podem ocorrer após do tratamento da planta com algumas rizobactérias promotoras de crescimento, o primeiro decorrente da produção pelo microrganismo na rizosfera e o outro devido ao estímulo à síntese do hormônio pela própria planta (GAUDIN *et al.*, 1994). A auxina mais comumente produzida na natureza é o ácido indol-acético (AIA), sintetizada principalmente em rotas bioquímicas dependentes de triptofano. Várias rotas de produção, constitutivas ou induzidas, são conhecidas em rizobactérias, principalmente as do gênero *Pseudomonas*, envolvendo a participação de genes plasmidiais ou presentes no DNA cromossômico (GLICK *et al.*, 1999).

A maioria da bactérias presentes no solo são capazes de produzir AIA, podendo essa ser uma estratégia para detoxificação do excesso de triptofano liberado pelas raízes na rizosfera, aminoácido que pode ser deletério às células bacterianas. Além disso, KATSY (1997) sugere o envolvimento de AIA na regulação da produção de outros compostos importantes no desenvolvimento bacteriano. Isolados promotores de crescimento em plantas, na verdade, favorecem indiretamente o 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 *P. fluorescens* super produtor de AIA estimulou o desenvolvimento radicular de estacas de groselheira-preta e inibiu as de cerejeira (DUBEIKOVSKY, *et al.*, 1993). Isso indica que o efeito da 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.

2.2.2. Síntese de ACC deaminase: inibição de etileno

HALL *et al.* (1996) sugerem que um dos mecanismos mais importantes envolvido 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 plantas. No entanto, seu acúmulo apresenta efeito inibitório na posterior alongação das raízes formadas. Esse fitohormônio tem como precursor imediato o ácido carboxílico aminociclopropano (ACC), que por sua vez é derivado do AIA. GLICK *et al.* (1998) propuseram um modelo para explicar como rizobactérias capazes de utilizar o ACC poderiam atuar no crescimento radicular (Figura 1). Segundo esse modelo, os isolados promotores de crescimento seriam atraídos para 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 alongação 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 o ACC é precursor do etileno,

a sua hidrólise leva a uma diminuição desse hormônio na planta, o que propiciaria uma maior alongação do sistema radicular.

A utilização de isolados bacterianos produtores de ACC deaminase pode ser uma alternativa bastante promissora a ser empregada principalmente na propagação vegetativa de muitas essências florestais.

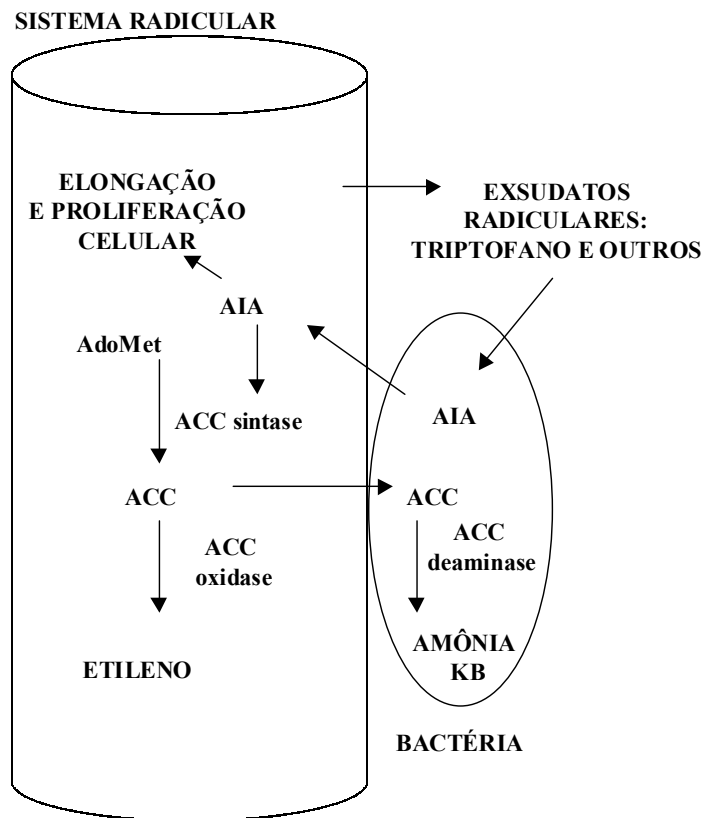


Figura 1 - Modelo da diminuição da concentração de etileno na planta por rizobactérias produtoras de ACCdeaminase (GLICK et. al, 1998).

2.2.3. Aumento da disponibilidade de nutrientes na rizosfera

Muitas rizobactérias associadas com plantas não leguminosas são capazes de fixar nitrogênio no solo e contribuir para um aumento na

disponibilidade desse elemento para as plantas. No entanto, Glick (1995), considera que a maioria das rizobactérias diazotróficas não simbiotes produz uma quantidade muito pequena de nitrogênio, quase toda utilizada para seu próprio crescimento.

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

O fósforo, elemento pouco móvel no solo, é um dos principais elementos que pode ter sua absorção aumentada com a utilização de rizobactérias. Esse efeito se deve não só à capacidade de alguns isolados promotores de crescimento de solubilizarem esse elemento via produção de enzimas e ácidos orgânicos, como também em decorrência da maior área de solo explorada pelo sistema radicular mais bem desenvolvido. 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).

2.3. Utilização de rizobactérias promotoras de crescimento como alternativa para produção de essências florestais

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento na área florestal ainda é muito pequena quando comparada ao setor agrícola. Entretanto, tem surgido como tecnologia promissora a ser empregada para aumento no acúmulo de biomassa em diferentes essências florestais, podendo propiciar ganhos de 15 a 30% e, em casos especiais, até mesmo dobrar a biomassa produzida (CHANWAY, 1997).

A maioria desses trabalhos são realizados no Canadá com coníferas, principalmente dos gêneros *Pinus* e *Picea*, utilizando mudas seminais. Em *Pinus*, após tratamento do sistema radicular de mudas com um isolado de *Bacillus polymyxa*, observou-se um acúmulo de biomassa variando de 14 a 33% após um ano de plantio, em sítios de qualidade baixa a intermediária, e um

efeito negativo de 20% em sítios de alta qualidade, o que precisa ser melhor observado e explicado (CHANWAY e HOLL, 1994). Os autores especulam que esse efeito negativo ocorreu devido a um aumento muito grande na população da bactéria nos locais de melhor qualidade produtiva.

A possibilidade de aumento também na emergência de plântulas é demonstrada em abeto (*Picea* sp.) (CHANWAY, 1997).

Em eucalipto, um trabalho realizado com co-inoculação de *Azotobacter chroococcum* e *Bacillus megaterium* em mudas de *E. camaldulensis* levou a um incremento de 44% na biomassa (MOHAMMAD e PRASSAD, 1988). A possibilidade de controle biológico de algumas doenças dessa cultura por rizobactérias também existe. Bettiol *et al.* (1988) observaram uma redução da intensidade de mancha foliar causada por *Cylindrocladium scoparium* em folhas destacadas de eucalipto quando inoculadas com um isolado de *Bacillus* sp., similar à proporcionada por Benomil. Redução na incidência de tombamento de plântulas de eucalipto, causada pelo mesmo patógeno, variou de 71 a 85%, após aplicação de isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* (CAMPELLO, 1992).

A utilização de alguns isolados de rizobactérias para melhorar a micorrização de algumas espécies em condições de campo merece ser bem investigada. Os trabalhos nessa área ainda são poucos e muitas vezes contraditórios.

Outra possibilidade é o emprego dessas bactérias na produção de mudas em cultura de tecidos. Muitas das bactérias atualmente consideradas como contaminantes nesse sistema podem apresentar efeito positivo no enraizamento de explantes, como o observado para um isolado não identificado em micro-culturas de *Pinus elliotti* (BURNS e SCHWARZ, 1996).

Essa nova tecnologia cria um amplo campo de estudo na área florestal, principalmente na fase de produção de mudas, onde se tem um maior controle das condições do ambiente. Muito ainda há para se estudar mas as expectativas de sucesso são promissoras, abrindo um leque de possibilidades para utilização de rizobactérias promotoras de crescimento na obtenção de mudas bem formadas, com maior resistência a doenças e condições de estresse, possibilitando uma melhor performance das mesmas em condições de campo.

CAPÍTULO 1

PROMOÇÃO DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS E MINIESTACAS DE *Eucalyptus* spp. MEDIADA POR RIZOBACTÉRIAS

1. INTRODUÇÃO

Dentro os diversos organismos presentes na rizosfera, algumas bactérias assimióticas podem induzir um efeito positivo no crescimento de plantas (SCHROTH e HANCOCK, 1981), sendo denominadas por KLOEPPER e SCHROTH (1978) de "Plant growth promoting rhizobacteria" (PGPR), rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

As rizobactérias podem atuar promovendo crescimento de plantas de forma direta e/ou indireta. Indiretamente, o efeito se deve à supressão de microrganismos deletérios e/ou patogênicos (COOK e BAKER, 1983; MAHAFEE e KLOEPPER, 1994; DIGAT *et al.*, 1993; LUZ, 1996) ou via estimulação da interação planta-microrganismos benéficos, tais como fungos micorrízicos e *Rhizobium* sp.. 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 (MAHAFEE e KLOEPPER, 1994). Na maioria das

vezes, a promoção é estimulada pela atuação em conjunto de vários mecanismos, sejam eles diretos ou indiretos.

Vários autores relatam como efeito da utilização de rizobactérias promotoras de crescimento um maior desenvolvimento do sistema radicular (BROWN *et al.*, 1974; LIFSHITIZ *et al.*, 1987; GLICK *et al.*, 1994). Um efeito positivo de um isolado de *Pseudomonas putida* no enraizamento de estacas de *Vigna radiata* foi observado por MAYAK *et al* (1997). Em essências florestais, o efeito promotor de crescimento de rizobactérias foi bem relatado, principalmente em gimnospermas (*Pinus*, *Picea*, *Tsuga* e *Pseudotsuga*), em mudas oriundas de sementes ou propagadas *in vitro* (CHANWAY, 1997; ENEBACK *et al*, 1998). Em eucalipto, observou-se incremento de 44% na biomassa de mudas seminais de *E. camaldulensis* após co-inoculação com *Azotobacter chroococcum* e *Bacillus megaterium* (MOHAMMAD e PRASSAD, 1988). Todavia, não foram encontrados trabalhos sobre a utilização de bactérias na produção de mudas via estaquia dessa espécie.

Neste trabalho, objetivou-se obter isolados de bactérias da rizosfera de mudas de eucalipto e avaliar o potencial de sua utilização para estimular o enraizamento de estacas e miniestacas. Além disso, procurou-se determinar a capacidade de promoção de crescimento desses isolados em diferentes substratos de enraizamento e quando utilizados na produção de mudas de diferentes clones.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados de rizobactérias

Os isolados foram obtidos da rizosfera de mudas clonais de *Eucalyptus* com cerca de 35- 60 dias de idade, provenientes de empresas florestais localizadas em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Bahia. Segmentos de raízes com solo aderido foram colocados em Erlenmeyers contendo 20 ml de água destilada esterilizada, deixados em banho ultra-som (sonicação, potência de aproximadamente 40 kz) por 15 min., e posteriormente filtrados em camada dupla de gaze. Com uma parte do filtrado, realizou-se diluição em série na razão 1×10^{-1} até 1×10^{-5} , procedendo-se a semeadura em meio B de King (KMB) (KING *et al.*, 1954). Outra amostra do filtrado foi distribuída em tubos de ensaio esterilizados e colocados em banho-maria a 80°C/ 20 min para isolamento seletivo de *Bacillus* sp., e, posteriormente, diluída em série como descrito acima e plaqueada em meio 523 de KADO e HESKETT (1970). Após 24-48 h de crescimento (28°C/ escuro), as colônias com diferentes características morfológicas foram purificadas pelo método de estrias. As placas com KMB foram observadas sob luz ultravioleta (360 nm) e as colônias fluorescentes purificadas e repicadas para tubos com o mesmo meio. Após crescimento, as culturas foram mantidas a 4°C.

2.2. Testes de seleção

Foram realizados quatro ensaios em casa-de-enraizamento da Cenibra S.A em Belo Oriente- MG, onde em cada um deles testou-se um grupo diferente de isolados. Os isolados bacterianos foram cultivados em meio 523 de KADO e HESKETT (1970) por 48 h. Suspensões dos isolados foram preparadas a uma densidade ótica de 0,2 de absorvância, aferida em espectrofotômetro a 540 nm. Substrato natural à base de composto de casca de arroz carbonizada:vermiculita (1:1), foi usado para enchimento de tubetes plásticos cônicos (57 ml de capacidade) e posteriormente irrigado com as suspensões dos isolados (10 ml/tubete). No tratamento testemunha o substrato foi tratado apenas com água destilada. O melhor isolado observado no ensaio 1 foi utilizado também como comparador em todos os demais experimentos. Estacas de um clone comercial, híbrido natural de *Eucalyptus grandis* (Rio Claro), tratadas com uma solução de 6000 ppm de AIB (ácido indol butírico), preparadas conforme rotina da empresa, foram plantadas nesses tubetes e colocadas para enraizar em casa de enraizamento com temperatura média de 26-28°C e irrigação intermitente por nebulização, por 35 dias. Após esse período, avaliaram-se a porcentagem média de enraizamento e o peso médio do sistema radicular seco por estaca enraizada, para cada tratamento. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, cada uma delas constituída de dez estacas.

2.3. Identificação dos isolados

Amostras de DNA dos isolados bacterianos indutores potenciais de enraizamento foram extraídas segundo metodologia descrita por AUSUBEL *et al.* (1999) e enviadas à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” (Campinas, SP) para caracterização e identificação molecular, utilizando-se a análise filogenética de seqüências parciais de DNA ribossomal 16S (rDNA 16S). A metodologia constituiu na amplificação do DNA ribossomal 16S, a partir do DNA genômico das bactérias, mediante o uso da técnica de PCR. O par de “primers” utilizado foi o p27f e p152r, homólogos a regiões

conservadas do gene rRNA 16S de bactérias. Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram clonados em vetor plasmidial pGEM-T (Promega), purificados e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (ALFexpress, Pharmacia). Os “primers” utilizados para sequenciamento foram o M13 “forward reverse”. As seqüências parciais de rDNA 16S obtidas foram comparadas com as seqüências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados RDP (“Ribossomal Database Project”, USA: <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4. Eficácia dos isolados em diferentes substratos de enraizamento

Os dez isolados selecionados foram testados em três substratos de enraizamento: vermiculita pura; moinha de carvão + composto de casca de eucalipto + vermiculita (5:3:1) e composto de casca de arroz carbonizada + vermiculita (1:1), em dois ensaios conduzidos em fevereiro e março de 2001. O preparo das suspensões bacterianas e tratamento dos substratos ocorreram conforme a metodologia dos testes iniciais de seleção (item 2.2). Na leitura ótica utilizada nos ensaios (0,2 A), a concentração das suspensões dos isolados variou de 10^7 a 10^9 ufc/ml. Foram utilizadas miniestacas com cerca de 8 dias de idade de um clone de *E. grandis*, após tratamento da base das mesmas com solução de 2000 ppm de AIB. Após 35 dias em casa-de-enraizamento, nas mesmas condições descritas no item 2.2, avaliaram-se a porcentagem média de enraizamento e o peso do sistema radicular seco. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 11 tratamentos e três substratos. Utilizaram-se quatro repetições, cada uma com 30 estacas.

2.5. Eficácia dos isolados em diferentes clones de eucalipto

Os dez isolados selecionados foram testados em cinco clones de eucalipto: 1213 (híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*), 57 e 111 (híbridos naturais

de *E. grandis* -Rio Claro), C129 e C7074 (*E. grandis*) em ensaios conduzidos em fevereiro e março de 2001, no viveiro da Cenibra S.A, em Belo Oriente. Os experimentos foram montados como no item 2.2. Foram utilizadas miniestacas após tratamento da base das mesmas com solução a 2000 ppm de AIB. As condições de condução e avaliação do ensaio foram como previamente descritas (itens 2.2 e 2.4). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 11 tratamentos e cinco clones. Utilizaram-se quatro repetições, cada uma delas com 30 estacas.

2.6. Produção de AIA (ácido indol acético) em meio líquido

Visando determinar a capacidade de produção de auxinas dos isolados bacterianos, quantificou-se a produção de AIA *in vitro* por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD ou HPLC), no departamento de Química da UFV. Utilizou-se uma metodologia adaptada de SRINIVASAN *et al.* (1996) e PRIKRYL *et al.* (1985).

Os isolados foram cultivados em Erlenmeyers com 200 ml de meio mineral básico suplementado com 0,5% de glucose e 0,02 % de L- triptofano, à 28°C, no escuro. Após 48h, o meio de crescimento foi centrifugado a 2000 x g por 20 min., e o sobrenadante filtrado em filtro bacteriológico (Milipore 0,45 µm). Para evitar oxidação dos compostos indólicos, foram adicionados ao filtrado 0,05 g de ditioneitol. Ajustou-se o pH de 15 ml do filtrado com HCl (1 M) para 2,7 e extraiu-se por 4 vezes em igual volume de acetato de etila (99,9%). Adicionou-se sulfato de magnésio para retirar o excesso de água e filtrou-se em filtro de papel. O acetato foi removido em evaporador rotativo a 37°C, e o resíduo seco coletado em 1,5 ml de etanol. Essa solução foi congelada e armazenada no escuro para posterior utilização em CLAD.

A solução em etanol foi filtrada para retirar impurezas e, a seguir, injetada no aparelho de cromatografia. Utilizou-se uma coluna Licrosorb RP-18 (10 µm) como fase reversa, solução de água-ácido acético-etanol (84,2:0,8:15) como fase móvel e comprimento de onda de 280 nm. Após 20 min. de corrida cromatográfica, efetuaram-se três leituras por isolado.

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção dos isolados de rizobactérias

Foram obtidos 107 isolados bacterianos. Destes, 46 (43%) apresentaram produção de pigmento fluorescente verde-amarelado em KMB. Os demais foram obtidos pelo método seletivo para isolamento de *Bacillus* sp.

3.2. Testes de seleção

Ensaio 1: Dos 20 isolados testados, quatro (20%) diferiram estatisticamente (Scott-Knott, 5%) da testemunha quanto a porcentagem de estacas enraizadas. Nenhum isolado apresentou efeito deletério significativo sobre o enraizamento. Três isolados foram selecionados por promoverem, ao mesmo tempo, ganhos significativos em relação à testemunha tanto no índice de enraizamento (porcentagem média de estacas enraizadas) quanto no peso do sistema radicular seco (Tabela 1). Observaram-se ganhos de até 62 % ou 42 %, respectivamente nas duas variáveis avaliadas.

Ensaio 2: Dos 29 novos isolados testados, dois (6,9%) comportaram como os mais promissores na indução de enraizamento (Tabela 2). A eficiência do isolado MF2 foi confirmada também nesse ensaio. Os ganhos observados

Tabela 1 - Porcentagem média de estacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco por estaca enraizada de *Eucalyptus* spp. em substrato tratado com isolados de rizobactérias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). Ensaio 1.

Isolado	Porcentagem média de estacas enraizadas (%)	Peso médio do sistema radicular seco/ estaca enraizada (mg)
R10 (MF2)	70 a	43,50 a
R1 (Ca)	68 a	50,12 a
R13 (CIIb)	60 a	44,30 a
R3	59 a	35,00 b
R19	53 b	40,80 b
R14	53 b	40,35 b
R4	52 b	43,45 b
R9	50 b	29,00 b
R12	50 b	33,83 b
R2	50 b	46,13 a
R5	48 b	33,20 b
R16	48 b	41,90 b
R17	46 b	36,50 b
R11	45 b	41,45 b
R18	45 b	35,10 b
R20	45 b	36,70 b
Testemunha	43 b	35,10 b
R7	40 b	33,60 b
R8	40 b	32,00 b
R6	38 b	40,00 b
R15	36 b	42,50 b
CV (Coeficiente de variação) %	22,03	17,30

Tabela 2 - Porcentagem média de estacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco por estaca enraizada de *Eucalyptus* spp. em substrato tratado com isolados de rizobactérias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). Ensaio 2.

Isolado	Porcentagem média de estacas enraizadas (%)	Peso médio do sistema radicular seco/ estaca enraizada (mg)
R29 (FL2)	65 a	51,32 a
R10 (MF2)	64 a	65,53 a
R28 (S1)	60 a	48,13 a
R26	54 b	36,25 b
R27	53 b	38,34 b
R25	50 b	49,89 a
R21	47 b	25,16 c
R33	43 c	25,07 c
R36	41 c	18,22 c
R49	41 c	12,45 c
R32	40 c	27,63 c
R41	40 c	12,76 c
R43	40 c	14,36 c
R23	37 c	22,04 c
R30	37 c	25,75 c
R48	37 c	12,34 c
R24	35 c	20,12 c
R46	35 c	14,32 c
R47	35 c	12,13 c
R50	35 c	12,15 c
R44	30 d	13,21 c
R34	30 d	21,34 c
R22	29 d	20,08 c
Testemunha	28 d	20,00 c
R40	28 d	16,08 c
R34	27 d	21,31 c
R37	26 d	36,35 c
R39	26 d	15,32 c
R45	25 d	12,89 c
R31	25 d	15,54 c
R35	24 d	35,32 b
R42	23 d	15,60 c
CV (Coeficiente de variação) %	18,52	16,34

foram maiores que os obtidos no Ensaio 1, superiores a 130% ou 220% para índice de enraizamento e peso médio do sistema radicular seco, respectivamente (Tabela 2).

Ensaio 3: Três isolados, excluindo-se o comparador (MF2), foram eficientes em promover um maior enraizamento. Observaram-se ganhos superiores a 85% no índice de enraizamento e de até 287% no peso do sistema radicular seco (Tabela 3).

Ensaio 4: Dois novos isolados induziram ganhos significativos para as duas variáveis medidas, propiciando incrementos superiores a 200% em relação à testemunha (Tabela 4).

De acordo com o critério de seleção adotado, aumento simultâneo no índice de enraizamento e biomassa de raiz produzida (peso médio de raiz seca), 10 isolados (9,3% do total testado) mostraram-se promissores (MF2, Ca, CIIb, FL2, S1, S2, FL1, R1, 3918, MF4). Em geral, os melhores isolados para porcentagem de enraizamento foram também os que induziram maior peso de raízes. No entanto, em alguns casos, isolados que induziram maior peso não tiveram efeito tão marcante no índice de enraizamento. Efeitos deletérios significativos sobre o enraizamento não foram observados.

3.3. Identificação dos isolados

A identificação molecular dos isolados selecionados pode ser observada na Tabela 5.

3.4. Eficácia dos isolados em diferentes substratos de enraizamento

Nos dois ensaios não se observou interação significativa entre isolados e substratos testados. Observaram-se efeitos de isolados (Figura 2) e de substrato (Figura 3), quando se avaliou o índice de enraizamento. Os isolados tiveram eficiência similar, independente do substrato utilizado. Para a variável peso do sistema radicular seco / miniestaca enraizada, só foi significativo o efeito de substrato (Figura 4) e apenas no ensaio 2. O composto de casca de arroz carbonizada + vermiculita (1:1), destacou-se dos demais substratos testados.

Tabela 3 - Porcentagem média de estacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco por estaca enraizada de *Eucalyptus* spp. em substrato tratado com isolados de rizobactérias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). Ensaio 3.

Isolado	Porcentagem média de estacas enraizadas (%)	Peso médio do sistema radicular seco/ estaca enraizada (mg)
R58 (S2)	72 a	52,56 a
R73 (FL1)	72 a	51,15 a
R67	70 a	36,27 b
R10 (MF2)	69 a	49,34 a
R76	67 a	50,92 a
R64	52 b	48,37 a
R51	52 b	49,41 a
R75	50 b	47,89 a
R53	50 b	46,30 a
R69	50 b	30,32 b
R70	49 b	32,56 b
R61	49 b	18,34 c
R52	49 b	35,52 b
R71	49 b	20,35 c
R59	48 b	32,06 b
R79	48 b	16,45 c
R54	45 b	18,69 c
R57	45 b	31,57 b
R65	44 b	15,08 c
R55	43 b	13,73 c
R62	42 b	29,45 b
R78	40 b	14,32 c
R77	40 b	12,74 c
R63	40 b	16,78 c
R80	40 b	20,59 c
R66	40 b	14,07 c
R60	38 b	15,97 c
Testemunha	38 b	13,56 c
R72	36 b	16,98 c
R68	35 b	18,67 c
R74	35 b	16,06 c
R56	34 b	14,63 c
CV (Coeficiente de variação) %	22,06	20,74

Tabela 4 - Porcentagem média de estacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco por estaca enraizada de *Eucalyptus* spp. em substrato tratado com isolados de rizobactérias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). Ensaio 4.

Isolado	Porcentagem média de estacas enraizadas (%)	Peso médio do sistema radicular seco/ estaca enraizada (mg)
R98 (3918)	67 a	56,97 a
R87 (MF4)	67 a	50,34 a
R103	63 a	32,89 b
R10 (MF2)	60 a	49,34 a
R81	56 a	34,56 b
R106	55 a	30,45 b
R101	55 a	28,76 b
R96	45 b	31,73 b
R89	45 b	30,45 b
R91	42 b	29,35 b
R83	42 b	17,04 c
R95	41 b	31,56 b
R82	41 b	30,34 b
R105	40 b	19,04 c
R100	39 b	27,37 c
R97	36 b	32,83 b
R84	37 b	30,48 b
R93	30 c	18,24 c
R104	30 c	19,54 c
R107	29 c	15,92 c
R88	23 c	29,05 b
R102	23 c	17,56 c
R85	22 c	14,89 c
R99	22 c	19,56 c
R86	22 c	20,04 c
R90	21 c	18,45 c
Testemunha	21 c	17,63 c
R92	21 c	18,05 c
R88	20 c	20,34 c
CV (Coeficiente de variação) %	26,09	18,57

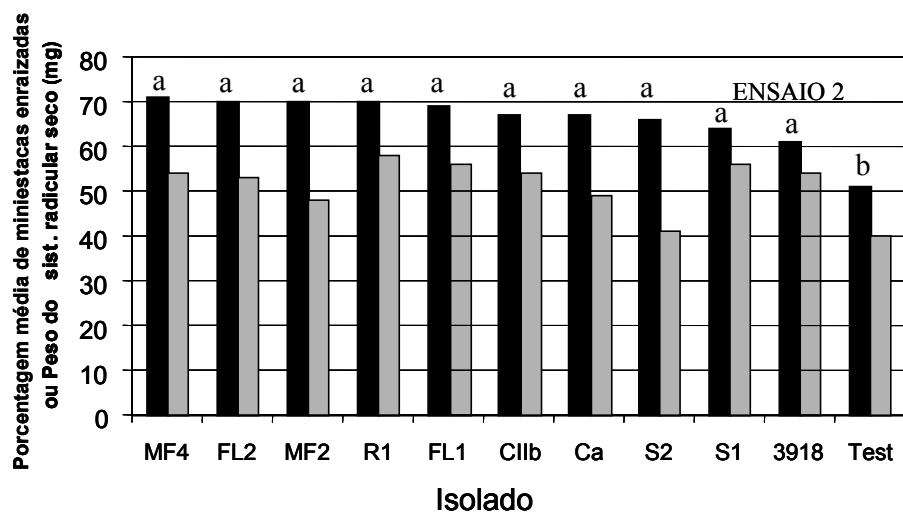
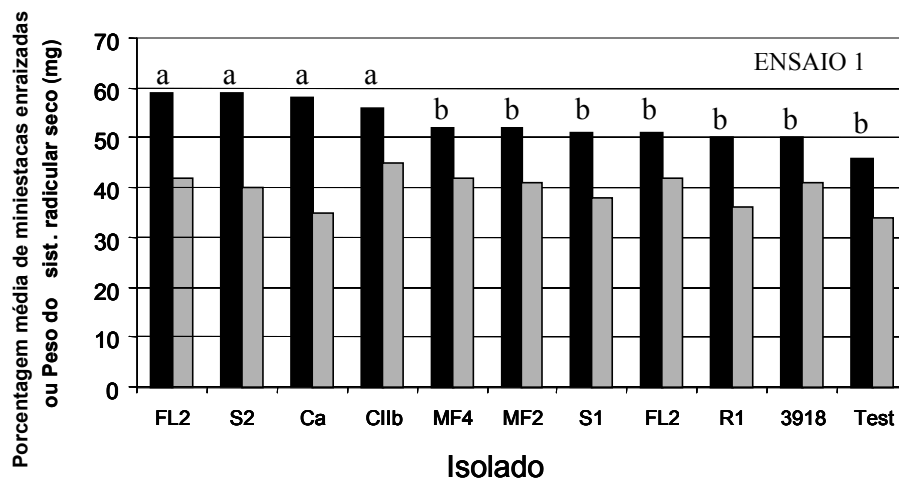
Tabela 5 - Identificação molecular dos isolados de rizobactérias selecionados como promotores de enraizamento em estacas de eucalipto.

Código do isolado	Identificação
R1 e FL1	<i>Frauteria aurantia</i> Swings <i>et al.</i> . 1980
MF4 e MF2	<i>Pseudomonas</i> sp. Migula 1894
Ca	<i>Pseudomonas fulva</i> Lizuga e Komagata 1963
FL2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter 1872) Migula 1900
CIIb	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Hugh 1981) Palleroni e Bradbury 1993/ <i>S. nitritireducens</i> Finkmann <i>et al.</i> . 2000
S1, S2 e 3918	<i>Bacillus subtilis</i> Cobn 1872/ <i>B. vallismortis</i> Roberts <i>et al.</i> . 1996

3.5. Eficácia de isolados de rizobactérias em diferentes clones de eucalipto

No primeiro ensaio (fevereiro 2001), observou-se interação significativa entre isolado-clone, quando se avaliou o índice de enraizamento (porcentagem média de miniestacas enraizadas) (Tabela 7). O mesmo não foi observado para a variável peso médio do sistema radicular seco / miniestaca enraizada. Constataram-se, contudo, diferenças significativas entre isolados, independentemente do clone utilizado (Figura 6).

No ensaio 2 (março 2001), não se observou interação significativa entre isolado-clone, sendo significativo o efeito de tratamento no enraizamento médio (Figura 7) e no peso do sistema radicular seco (Figura 6).



■ Porcentagem média de miniestacas enraizadas □ Peso de sist. radicular seco (mg)

Figura 2 - Porcentagem média de miniestacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco (peso de raiz seca/miniestaca enraizada) observadas após enraizamento de um clone de eucalipto em três substratos de enraizamento (vermiculita pura; moinha de carvão + composto de casca de eucalipto + vermiculita (5:3:2) e composto de casca de arroz carbonizada + vermiculita (1:1)), tratados com 10 isolados de rizobactéria. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). CV= 16,70 % e 19,32 % (Ensaio 1); CV= e 26,03 % e 22,45 (Ensaio2), para porcentagem média de miniestacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco, respectivamente.

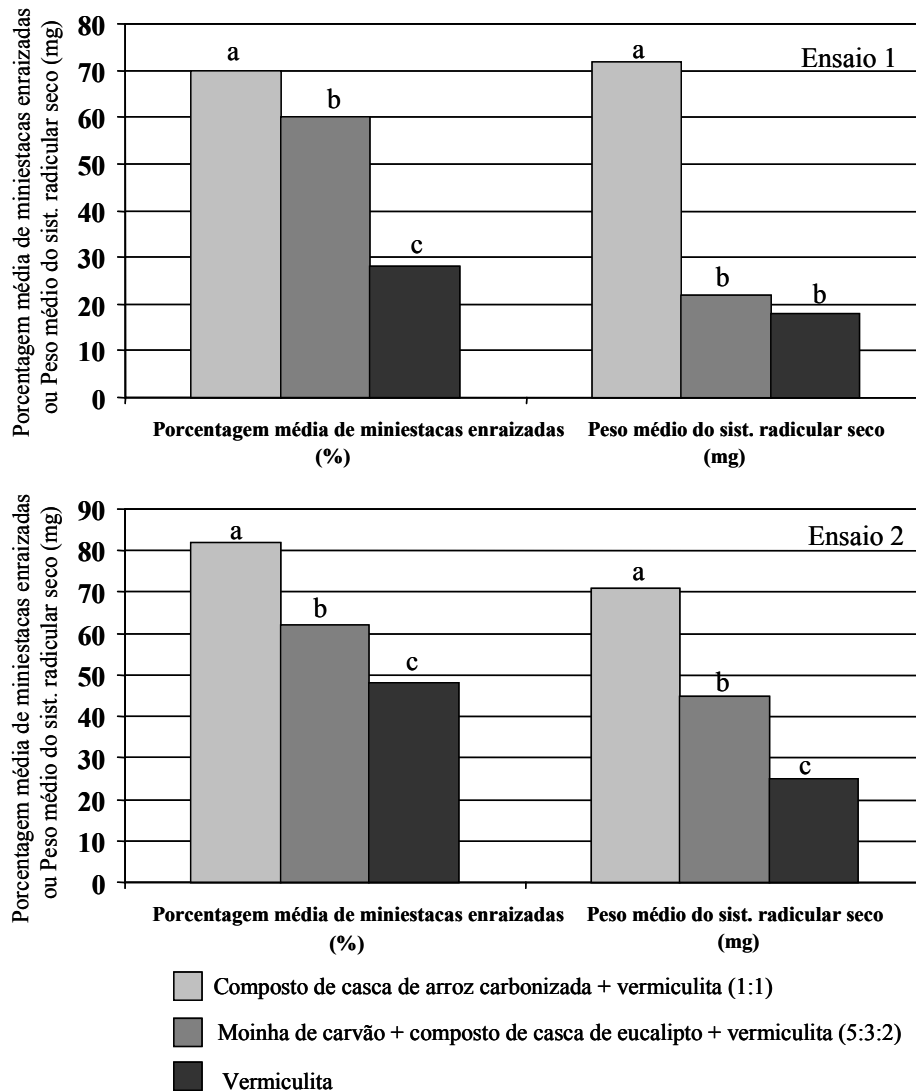


Figura 3 - Porcentagem média de miniestacas de eucalipto enraizadas e peso médio do sistema radicular seco, após 35 dias de aplicação de dez isolados de rizobactérias, observados em duas épocas diferentes (fev. e março de 2001) e utilizando-se três diferentes substratos de enraizamento (composto de casca de arroz carbonizada + vermiculita (1:1); moinha de carvão + composto de casca de eucalipto + vermiculita (5:3:2) e vermiculita). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). CV= 16,70 % e 29,32 % (Ensaio 1); CV= 16,03 % e 36,45% (Ensaio2), para porcentagem média de enraizamento e peso médio do sistema radicular seco, respectivamente.

Tabela 6 - Porcentagem média de miniestacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco observados após tratamento de cinco clones com isolados de rizobactérias, em ensaios conduzidos em fev. e março de 2001. Médias de uma mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

Clone de eucalipto	Porcentagem média de miniestacas enraizadas		Peso médio do sistema radicular seco/ miniestaca enraizada (mg)	
	Ensaio 1	Ensaio2	Ensaio 1	Ensaio2
Clone 57	90,50 a	97,37 a	96,48 a	98,76 a
Clone 7074	74,54 a	95,65 a	52,78 b	78,34 b
Clone 1213	53,13 b	90,50 b	49,52 b	76,09 b
Clone 129	50,67 b	86,16 c	49,37 b	65,23 c
Clone 111	41,01 c	76,64 d	37,39 c	40,54 d
CV %	17,66	8,40	34,46	14,34

Tabela 7 - Porcentagem média de miniestacas enraizadas de cinco clones de eucalipto, após 35 dias de tratamento do substrato com isolados de rizobactérias. Médias em uma mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV = 17,66%.

Clone	Porcentagem média de miniestacas enraizadas (%)										
	Isolado										
	Test	FL1	FL2	MF2	MF4	CIIb	R1	3918	Ca	S1	S2
1213	37,7b	47,7b	61,1a	74,4a	53,3a	58,9a	46,b	55,5a	72,2a	34,4b	42,2b
57	73,3c	95,5a	97,8a	93,3a	98,9a	94,4a	83,3b	85,5b	93,3a	85,5b	94,4a
7074	51,1d	91,1a	74,4c	83,3c	72,2c	70 c	68,9c	74,4c	73,3c	81,1b	80 b
111	40,7c	42,2c	57,8a	36,7a	27,2e	48,9b	40,6c	58,9a	27,4e	35 d	44,4c
129	63,3f	61,1f	85,5a	68,9e	76,7b	74,4c	64,4f	63,3f	67,8e	72,2d	76,7b

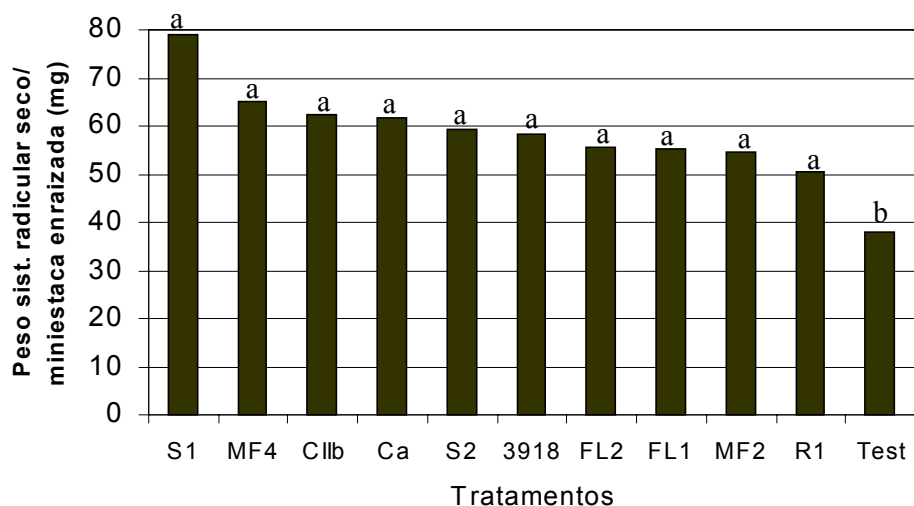
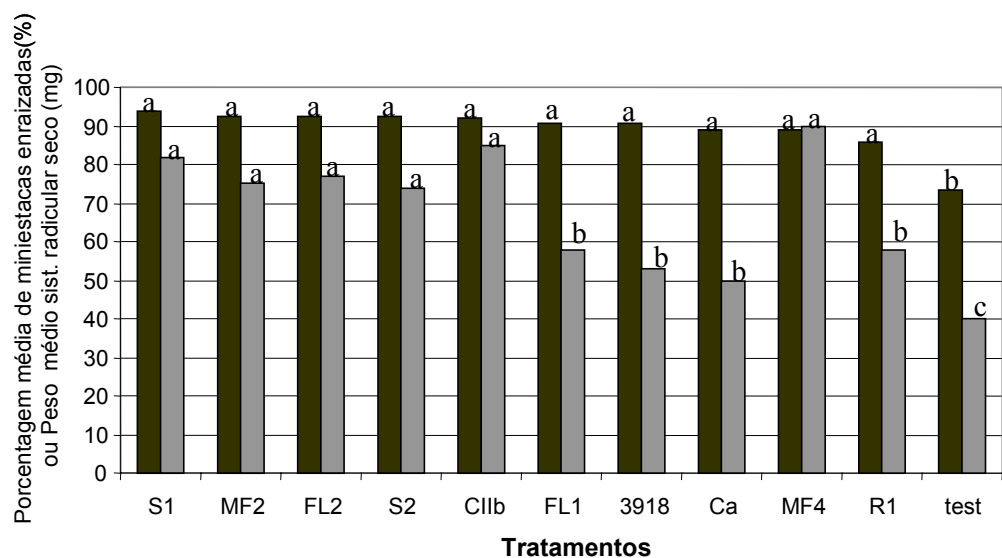


Figura 6 - Peso médio do sistema radicular seco por miniestaca de eucalipto enraizada (média de cinco clones), após 35 dias de tratamento com rizobactérias, em fev. de 2001 (Ensaio 1). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%). CV= 34,46 %.



■ Porcentagem média de miniestacas enraizadas ■ Peso sist. radicular seco/miniestaca enraizada (mg)

Figura 7 - Porcentagem média de miniestacas de eucalipto enraizadas e peso médio do sistema radicular seco observados em substrato tratado com diferentes isolados de rizobactérias (média de cinco clones), em março de 2001 (Ensaio 2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Scott-Knott, 5%). CV = 8,40% e 14,34 para porcentagem média de miniestacas enraizadas e peso médio do sistema radicular seco, respectivamente.

Para as duas variáveis avaliadas, observaram-se diferenças significativas entre clones, independente do tratamento (Tabela 6). Os índices de enraizamento médio por clone no ensaio 2 foi superior aos encontrados no ensaio 1 (Tabela 6).

3.6. Determinação da produção de AIA (ácido indol acético) em meio líquido

Dos dez isolados testados, apenas dois apresentaram produção de AIA *in vitro*, mesmo assim em quantidades muito pequenas, 0,7 µg/ml para o isolado 3918 (*Bacillus subtilis*) e 0,67 µg/ml para MF4 (*Pseudomonas* sp.).

4. DISCUSSÃO

Isolados de rizobactérias associados à mudas obtidas por propagação vegetativa de eucalipto aumentaram o enraizamento em estacas e miniestacas, quando veiculados no substrato. Vários autores relatam o envolvimento de bactérias na promoção do desenvolvimento do sistema radicular de várias culturas. BURNS e SCHWARZ (1996) observaram o estímulo no enraizamento adventício em explantes de *Pinus elliottii in vitro*, produzido por um isolado não identificado de bactéria, propiciando ganhos de 15% a 90% em relação à testemunha. No entanto, há poucos trabalhos que mostram o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento na iniciação e no desenvolvimento de raízes adventícias em estacas. MAYAK *et al.* (1997), observaram maiores número e comprimento de raízes em estacas de feijão mungo em condições de laboratório, induzidos por *Pseudomonas putida*. O presente trabalho é o primeiro que mostra efeito positivo no enraizamento de estacas e miniestacas de eucalipto e que foi realizado sob condições operacionais de propagação clonal.

Observou-se ocorrência relativamente alta (cerca de 10%) de isolados promotores de crescimento associados a rizosfera de mudas de eucalipto. Porcentagem bem superior ao observado em diversos trabalhos de seleção em outras culturas, em geral variando de 1 a 5% (KLOEPPER *et al.*, 1980; BURR e CAESAR, 1982). Isso pode ser decorrente não simplesmente das características da cultura em si, mas, provavelmente, também determinado

pelo tipo de substrato usado para produção das mudas de onde os isolados foram obtidos e das condições de manejo. Em geral, os substratos de enraizamento utilizados possuem uma fração constituída por material orgânico obtida por processo de compostagem, o que pode favorecer a predominância de microrganismos benéficos (HOITINK e FAHY, 1986). ALVAREZ *et al.* (1995) observaram uma maior incidência de PGPR's na rizosfera de tomate quando adicionou-se composto ao substrato de crescimento. Os mesmos autores consideram a possibilidade da fração húmica do material compostado afetar positivamente o desenvolvimento da microbiota do solo. VALLINI *et al.* (1993) mostraram um aumento no número total de bactérias aeróbicas e actinomicetos na rizosfera de loureiro, após tratamento com ácido húmico. Além disso, deve-se levar em consideração a maior diversidade biótica encontrada em condições tropicais e subtropicais em relação às regiões temperadas.

Dos dez isolados selecionados, sete são dos gêneros mais comumente relatados como promotores de crescimento, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Deve-se procurar determinar o impacto da utilização desses organismos no ambiente e na saúde humana, haja visto que alguns deles, como *Pseudomonas aeruginosa*, podem se comportar como patógenos oportunistas em animais e plantas. O que pode ajudar a diminuir esse impacto é o fato de os mesmos já estarem presentes na rizosfera de eucalipto, o que se fez foi apenas aumentar sua concentração. Acredita-se que as concentrações utilizadas, variando de 10^7 a 10^9 ufc/ml, foram suficientes para determinar uma boa colonização da rizosfera. Outros trabalho devem ser realizados avaliando-se o efeito de diferentes concentrações dos isolados, bem como da utilização conjunta de alguns deles.

Constatou-se efeito significativo do tipo de substrato usado no enraizamento. No entanto, não se observou uma interação entre substrato-isolado, o que facilita a utilização desses isolados por várias empresas florestais. Mesmo em um substrato praticamente inerte do ponto de vista biológico, vermiculita pura, observaram-se ganhos decorrentes dos tratamentos com rizobactérias, o que pode ser um indício de envolvimento de mecanismos diretos, provavelmente fitohormônios, na promoção de enraizamento. Essa constatação viabiliza a aplicação desses isolados em empresas florestais que utilizem diferentes substratos de enraizamento.

Estima-se que 80% dos isolados bacterianos presentes no solo são capazes de produzir AIA (GLICK *et al.*, 1999). Essa tendência não foi observada neste trabalho, onde apenas dois isolados (20%) foram capazes de produzir AIA *in vitro* (menos de 1 µg/ml). A quantidade produzida de AIA foi muito baixa, considerando-se que em condições de campo utiliza-se a aplicação de 100 até 2000 µg/ml (100 a 2000 ppm) de AIB (ácido indol-butírico) para indução de enraizamento em estacas e miniestacas de eucalipto, sendo o segundo indutor mais potente que o primeiro. No entanto, isso não descarta a importância da liberação de pequenas quantidades de AIA na rizosfera como indutores de enraizamento, visto que pode ser um fornecimento constante e não concentrado, como um tratamento homeopático. Além disso, outros compostos indólicos podem estar envolvidos, tais como ácido indol-pirúvico, indol-acetamida e ácido-indol-carboxílico (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), o que pode ser detectado avaliando-se o acúmulo de AIA endógeno após o tratamento com rizobactérias.

O presente trabalho não objetivou estudar os mecanismos de atuação desses isolados, o que deve ocorrer em trabalhos futuros. É possível que a enzima ACC (carboxilato-aminociclopropano) deaminase esteja envolvida no processo, como proposto por GLICK *et al.* (1998) para explicar a habilidade de rizobactérias em estimular a elongação de raízes. O conhecimento dos mecanismos de atuação podem ajudar a potencializar a promoção de crescimento, otimizando a aplicação prática dos isolados em condições de campo.

Uma certa especificidade de isolados de PGPR's por seu hospedeiro tem sido observada. Isolados promotores de crescimento em uma espécie de planta podem não ser efetivos em outras (SCHROTH e HANCOCK, 1982). Diferenças na quantidade e qualidade de exsudatos radiculares de diferentes espécies de plantas, bem como de cultivares e genótipos de uma mesma espécie têm sido relatadas (BALDANI e DOBEREINER, 1980; SHISHIDO e CHANWAY, 1999) e podem explicar uma possível especificidade isolado-genótipo. Em um dos ensaios montados para verificar a ocorrência dessa interação entre isolado de rizobactéria e genótipo de eucalipto, a mesma foi

detectada, o que não ocorreu no ensaio posterior. Os índices de enraizamento médio para todos os clones foi bem superior no segundo ensaio, devido as melhores condições fisiológicas das brotações utilizadas como propágulos. No primeiro ensaio houve maior heterogeneidade no material propagativo. Desta forma, pode-se cogitar a possibilidade de que, em condições de estresse, as diferenças entre exsudatos de diferentes genótipos de eucalipto possam se tornar mais marcantes, talvez até decorrente não do genótipo em si mas das diferenças entre o estado fisiológico das brotações. Nas condições ótimas de enraizamento observados no segundo ensaio, todos os tratamentos com rizobactérias apresentaram ganhos significativos em relação à testemunha não tratada. ROVIRA (1969) mostrou que podem ocorrer variações na quantidade e natureza de aminoácidos presentes nos exsudatos radiculares dependendo das condições ambientais, tais como luminosidade, temperatura e nível de adubação. Há relatos de que aminoácidos são responsáveis pela atratividade de rizobactérias por exsudatos de sementes e raízes (SCHER et al., 1985). Características de exsudatos de diferentes clones de eucalipto ainda não foram determinadas e seria interessante conhecer suas diferenças quali e quantitativas, bem como o efeito do manejo das cepas sobre os mesmos, para tentar explicar melhor a ocorrência ou não de especificidade isolado-clone.

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento no setor florestal tem se mostrado uma tecnologia emergente nos últimos anos e o presente trabalho é pioneiro em demonstrar a possibilidade de sucesso de utilização das mesmas na propagação vegetativa de eucalipto. Os maiores ganhos obtidos no enraizamento de estacas (110%) foram bem superiores aos observados em miniestacas (20-40%). No entanto, isso ainda significa um aumento expressivo, visto que a técnica de miniestaquia propiciou um ganho de no máximo 40% de enraizamento em relação à estaquia convencional (ASSIS, 1997) e, no caso do tratamento com rizobactérias, não seria necessário nenhum ajuste no manejo ou na infra-estrutura dos viveiros. Levando em consideração a grande quantidade de mudas produzidas por dia em um viveiro de uma grande empresa florestal (mais de 100.000 mudas), o retorno econômico advindo de um aumento de 20-40 % desse número é bem expressivo. Somando-se a esse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física desses viveiros, visto que os isolados

bacterianos podem ajudar a diminuir o tempo que as miniestacas necessitem permanecer em casa-de-vegetação para um bom enraizamento. Os isolados selecionados foram eficientes em várias condições e em diferentes genótipos o que viabiliza a sua utilização em larga escala. Estudos de formulação ainda são necessários, de preferência empregando-se a própria fração orgânica utilizada no preparo dos substratos de enraizamento como veículo. Além disso, o conhecimento dos mecanismos de atuação podem ajudar a potencializar a promoção de crescimento, otimizando a aplicação prática dos isolados em condições de campo. Abre-se aqui um vasto campo de estudo visando aproveitar ao máximo o potencial de rizobactérias na eucaliptocultura.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A propagação vegetativa de eucalipto por meio da técnica de miniestaquia vem sendo amplamente empregada nas principais empresas florestais do país. No entanto, ainda se verifica heterogeneidade quanto ao enraizamento entre os genótipos, principalmente na fase inicial de adaptação dos clones. Deste modo, técnicas alternativas que otimizem o enraizamento de estacas e miniestacas de eucalipto são fundamentais para melhorar a qualidade das mudas e reduzir o custo de produção. Além de potencialmente poderem atuar como promotoras de enraizamento, a utilização de rizobactérias na multiplicação clonal de eucalipto, pode propiciar a obtenção de mudas com maior resistência às doenças associadas a viveiros de propagação. Testaram-se 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, quanto ao seu potencial como promotores de enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp. Para tanto, amostras de substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada : vermiculita (1:1) foram tratados com 10 ml de uma suspensão de cada isolado ($OD_{540} = 0,2A$)/tubete, correspondendo à cerca de 10^8 ufc/ml. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, cada uma delas constituídas por 10 estacas. Aos 30 dias, avaliou-se o enraizamento médio (porcentagem média de estacas enraizadas) e o peso médio do sistema radicular seco. Dez isolados destacaram-se como excelentes indutores de enraizamento, propiciando ganhos de até 110% no enraizamento

médio e de até 250% no peso de raiz. Esses isolados também foram eficientes no enraizamento de miniestacas, cujos ganhos variaram de acordo com o clone e isolado testados. Também se avaliou o efeito dos 10 isolados como promotores de enraizamento em três diferentes substratos: vermiculita pura; moinha de carvão:composto de casca de eucalipto :vermiculita (5:3:2) e composto de casca de arroz carbonizada:vermiculita (1:1). Não se observou interação isolado-substrato, sendo que o substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada foi muito superior, quanto à porcentagem de enraizamento e ao peso médio de raízes. Os maiores ganhos obtidos no enraizamento de estacas (110%) foram bem superiores aos observados em miniestacas (20-40%). No entanto, isso ainda significa um aumento expressivo, visto que a técnica de miniestaquia propiciou um ganho de no máximo 40% de enraizamento em relação à estaquia convencional e, no caso do tratamento com rizobactérias, não seria necessário nenhum ajuste no manejo ou na infraestrutura dos viveiros. Somando-se a esse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física desses viveiros, ao se diminuir o tempo que as miniestacas necessitem permanecer em casa-de-vegetação para um bom enraizamento. Os isolados selecionados foram eficientes em várias condições e em diferentes genótipos o que viabiliza a sua utilização em larga escala. Estudos de formulação ainda são necessários, de preferência empregando-se a própria fração orgânica utilizada no preparo dos substratos de enraizamento como veículo. Além disso, o conhecimento dos mecanismos de atuação podem ajudar a potencializar a promoção de crescimento, otimizando a aplicação prática dos isolados em condições de campo. Abre-se aqui um vasto campo de estudo visando aproveitar ao máximo o potencial de rizobactérias na eucaliptocultura.

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA POR RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM *Eucalyptus* spp. À FERRUGEM (*Puccinia psidii*) E À MANCHA-DE-CYLINDROCLADIUM

1. INTRODUÇÃO

Rizobactérias não patogênicas podem induzir em plantas resistência sistêmica a vários patógenos, como demonstrado para várias espécies de fungos, bactérias e vírus (VAN LOON *et al.*, 1998). Vários trabalhos mostram a atuação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas como agentes de biocontrole, e para algumas delas já foi demonstrado o envolvimento de mecanismos de resistência sistêmica induzida (ISR) no controle de patógenos foliares (VAN PEER *et al.*, 1991, WEI *et al.*, 1991). Esse tipo de resposta é fenotipicamente similar a resistência sistêmica adquirida (SAR) induzida por fitopatógenos, no entanto o termo “induced systemic resistance” (ISR) foi proposto por KLOPPER *et al.* (1992) para o caso em que a resistência é induzida por agentes bióticos não patogênicos. Os principais determinantes bacterianos de indução de resistência sistêmica que podem funcionar como

elicitores são os lipopolissacarídeos presentes na membrana (LPS), sideróforos e ácido salicílico (VAN LOON *et al.*, 1998).

Ao contrário do observado para SAR, na ISR não se observa o acúmulo de proteínas PRs, a indução não depende de salicilato e nem se observam alterações visuais como necrose na planta induzida (VAN LOON *et al.*, 1998; ROMEIRO,1999). Entretanto, em alguns casos, a ISR pode ser não só fenotipicamente mas também mecanisticamente idêntica à SAR, levando a um acúmulo de proteínas PRs e dependente de salicilato (VAN LOON *et al.*,1997).

A separação espacial entre patógeno e indutor facilita a determinação da ocorrência ou não da resistência sistêmica. Em geral esse tipo de resposta necessita de um tempo de ativação para ser observada e é efetiva contra uma ampla gama de fitopatógenos (STEINER e SCHONBECK,1995; ROMEIRO,1999).

No capítulo anterior, obtiveram-se alguns isolados de rizobactérias promotores de enraizamento em eucalipto. Considerando o efeito já descrito em outros patossistemas para isolados de PGPRs, o presente trabalho teve como objetivo averiguar a indução de resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum*, pelos isolados de rizobactérias pré-selecionados como promotores de enraizamento em estacas e miniestacas de *Eucalyptus*,

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 10 isolados de rizobactérias promotores de enraizamento em estacas e miniestacas de eucalipto: dois isolados de *Frateria aurantia* (R1 e FL1), dois de *Pseudomonas* sp. (MF4 e MF2), um de *Pseudomonas fulva* (Ca), *P. aeruginosa* (FL2) e *Stenotrophomonas nitritireducens* (CIIb) e três de *Bacillus subtilis* (S1, S2 e 3918).

2.1. Indução de resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*)

As mudas utilizadas nos ensaios foram produzidas na Cenibra S.A., Belo Oriente - MG. Para tanto, tubetes plásticos cônicos (57 ml de capacidade), contendo substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada:vermiculita (1:1) foram tratados com 10 ml de suspensão dos isolados bacterianos (Absorvância_{540nm} = 0,2). As testemunhas foram irrigadas apenas com água destilada. Estacas do clone 1213, híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, tratadas com uma solução de 500 ppm de AIB (ácido indol butírico), preparadas conforme rotina da empresa, foram plantadas nesses tubetes e colocadas para enraizar. Após 80 dias essas mudas foram levadas ao Departamento de Fitopatologia da UFV para determinar a possibilidade de indução de resistência à ferrugem. Nas inoculações, usou-se um isolado de *P. psidii* obtido de *Eucalyptus* sp., em Belo Oriente, MG. Esse isolado foi

multiplicado em mudas de jameiro (*Syzygium jambos*) e os esporos coletados aos 12 dias após a inoculação. Os esporos foram colocados em água com Tween 80 (0,05%) e atomizados (2×10^4 esporos/ml) homoganeamente em ambas as fases dos limbos foliares com auxílio de De Vilbiss nº 15, acoplado a um compressor elétrico (0,6-0,8 kgf/cm²). As mudas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro, no escuro por 24h, e posteriormente levadas para câmara de crescimento a 22°C, com fotoperíodo de 12 horas (RUIZ *et al.*, 1989) e intensidade luminosa de 40 μ moles fótons/m²/s. As avaliações foram feitas 13 dias após a inoculação utilizando-se uma escala diagramática com quatro classes de severidade (S0, S1, S2 e S3) (JUNGHANS, 2000) e quantificou-se o número médio de pústulas por folha, soros por área foliar (1,13cm²) e de esporos por soro (RUIZ *et al.*, 1989). Este ensaio foi repetido em duas épocas diferentes a fim de confirmar os resultados obtidos. Utilizaram-se quatro repetições, cada uma com quatro plantas, em delineamento inteiramente casualizado.

Inicialmente, os segundos e terceiros pares de folhas de cada planta foram avaliados visualmente. No segundo ensaio, o diâmetro de 40 pústulas em cada repetição e o número de soros foram determinados, em uma lupa estereoscópica com uma escala métrica acoplada, a fim de assegurar o melhor uso da escala de severidade que se baseia no tipo de reação da planta, diâmetro das pústulas e número de soros por pústulas.

Para avaliar o número médio de pústulas/folha, soros/área foliar e urediniosporos/soro empregaram-se os segundos e terceiros pares de folhas de cada planta que foram levados ao laboratório para as quantificações. Em lupa estereoscópica contou-se o número de pústulas em cada folha. Sob binocular, determinou-se o número de soros compreendidos em quatro discos de área 1,13 cm² (diâmetro = 1,2 cm), que foram retirados na região central de cada folha. Para determinação do número médio de urediniosporos/soro, os quatro discos coletados por folha foram colocados em tubos de ensaio contendo 3 ml de água + Tween 80 (0,1%) e agitados em vortex por 5 minutos, realizando-se duas leituras por tubo e determinando-se o número médio de esporos em câmara de Neubauer. Como já se conhecia o número médio de soros em cada círculo, pode-se obter o número médio de esporos produzidos por soro.

2.2. Efeito do tempo decorrente entre tratamento com rizobactéria e inoculação do patógeno (*P.psidi*) na indução de resistência

Os dois melhores isolados do Ensaio 1, FL2 e MF4, foram usados para tratamento de mudas em dois diferentes tempos antes da inoculação do patógeno. Um lote de plantas foi enraizado em substrato tratado com rizobactérias, como descrito no item 2.1, e outro lote irrigado com os possíveis indutores de resistência apenas uma semana antes da inoculação com o patógeno. Para isso, usaram-se 30 ml de cada suspensão bacteriana ($Abs_{540nm} = 0,2$) ou água destilada para irrigação do sistema radicular de cada muda. A inoculação com o patógeno e a condução do ensaio foram semelhantes as condições do item 2.1. Aos 13 dias da inoculação do patógeno, avaliaram-se o número médio de pústulas por folha e o número médio de soros por área foliar (item 2.1). O ensaio foi montado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de quatro plantas cada.

2.3 Indução de resistência à mancha de *Cylindrocladium candelabrum*.

O tratamento com rizobactérias foi como previamente descrito no item 2.1. Após 80 dias do tratamento com as bactérias, as mudas foram inoculadas com discos de micélio (1 cm de diâmetro) de um isolado de *Cylindrocladium candelabrum* retirados das bordas de colônias com 7 dias de idade crescidas em BDA (batata-dextrose-ágar). Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara de nevoeiro no escuro por 24h, e posteriormente levadas para câmara de crescimento a 22°C com fotoperíodo de 12 horas. Ao oitavo dia da inoculação mediu-se a área das lesões. Utilizaram-se quatro repetições, cada uma com quatro plantas em delineamento inteiramente casualizado.

3. RESULTADOS

3.1. Indução de resistência à ferrugem

O uso da escala diagramática sem medições não permitiu separar o efeito das rizobactérias. Em todos os tratamentos as folhas foram classificadas na classe S2 e S3. Visando assegurar o melhor uso da escala, no segundo ensaio, determinou-se o diâmetro médio das pústulas e o número médio de soros/pústula, o que possibilitou a separação entre tratamentos, destacando-se os isolados FL2 e 3918 (Tabela 1).

No primeiro ensaio, para quatro isolados de rizobactérias (FL2, 3918, FL1 e MF4), o número médio estimado de pústulas por folha foi significativamente inferior à testemunha, destacando-se o isolado FL2 (*P. aeruginosa*) (Figura 1). No segundo ensaio, tratamentos com todos os isolados bacterianos diminuíram significativamente o número de pústulas. Nesse ensaio, como no anterior, confirmou-se a maior eficiência de controle do isolado FL2, juntamente com o MF4, propiciando reduções maiores que 60% (Figura 1).

Nos dois ensaios, todos os isolados diferiram significativamente da testemunha não tratada, quanto ao número médio de soros/área foliar. No ensaio 1, destacaram-se os isolados FL2, MF4, com reduções superiores a 77% do número médio de soros por disco foliar (1,13 cm²) (Figura 2) e a 39%

Tabela 1 - Diâmetro médio de 40 pústulas, número médio de soros/pústula e classes de severidade de ferrugem em mudas com 80 dias de idade tratadas com rizobactérias, com base na escala de Junghans (2000).

Tratamento	Diâmetro médio de pústula (mm)	Número médio de soros/pústula	Classe de severidade
FL2	1,28	9,34	S2
3918	1,34	10,75	S2
MF4	1,95	18,63	S3
FL1	1,97	19,45	S3
MF2	2,13	22,06	S3
S2	2,45	20,34	S3
S1	2,47	22,45	S3
R1	2,52	35,25	S3
CIIb	2,61	34,54	S3
Ca	2,66	30,32	S3
Testemunha	2,66	31,54	S3

no número médio de esporos/soro (Figura 3). Além deles, os isolados 3818 e Ca também se destacaram na redução do número médio de soros/área foliar e de esporos/soro, respectivamente. No ensaio 2, destacou-se o isolado FL2 na redução do número médio de soros/área foliar. Para número de esporos/soro somente o isolado S2 não diferiu da testemunha (Figura 3). Dois dos melhores isolados do ensaio 1 se mantiveram como melhores no ensaio 2, FL2 e MF4.

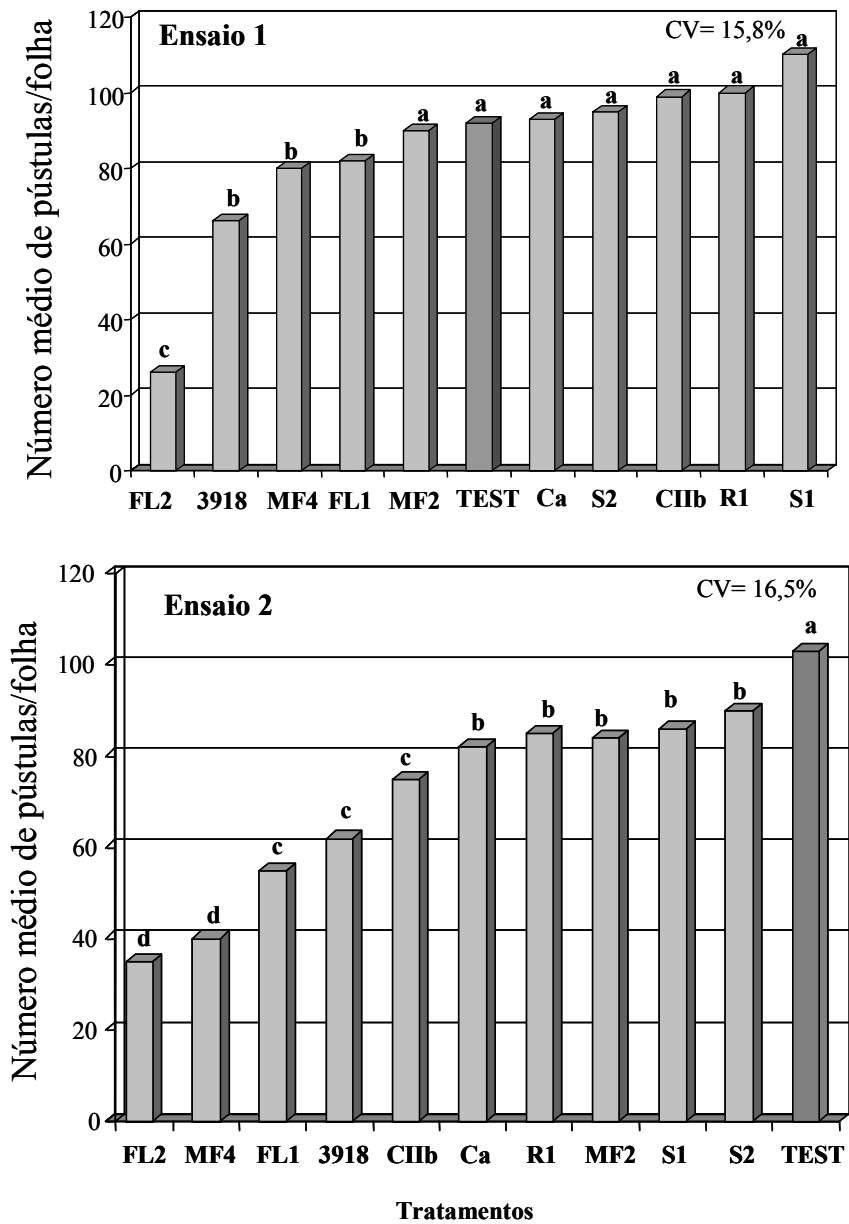


Figura 1 - Número médio de pústulas de ferrugem em folhas de mudas de eucalipto tratadas com rizobactérias. Médias com mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

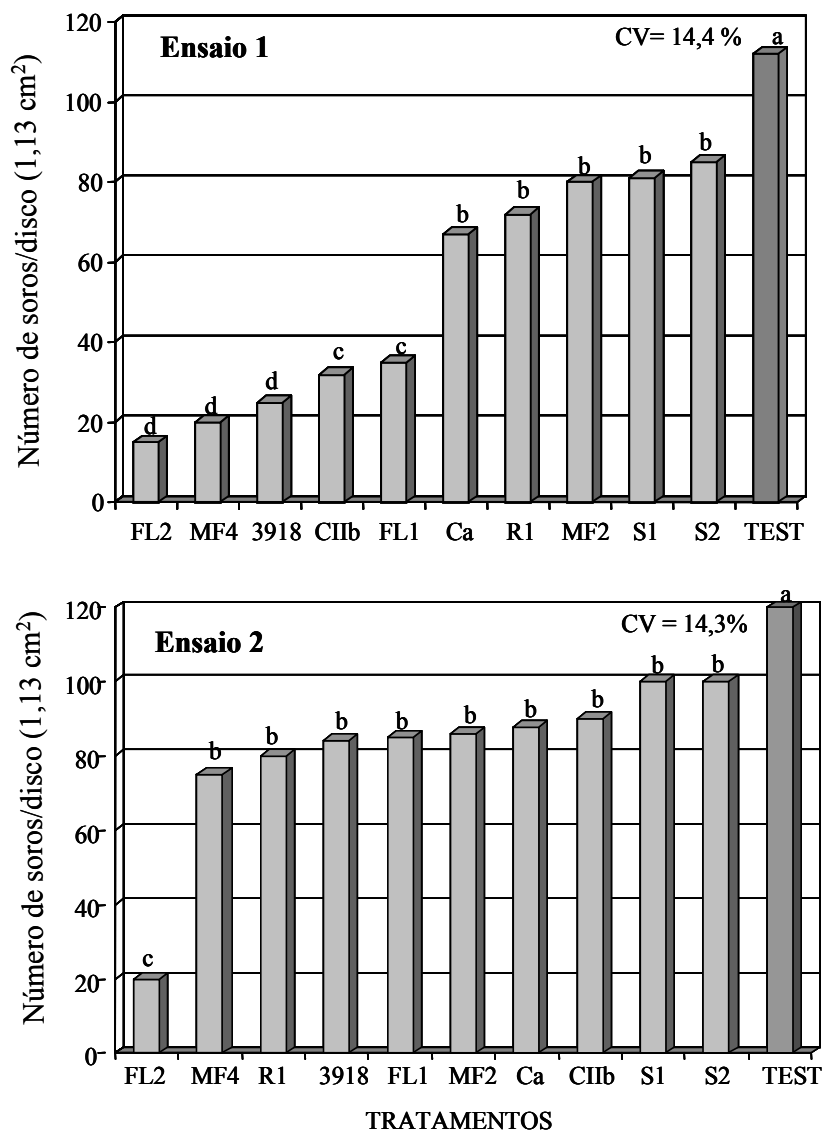


Figura 2 - Número médio de soros de ferrugem em discos de folhas (1,13cm²) de mudas de eucalipto tratadas com rizobactérias em dois ensaios realizados em câmara de crescimento. Médias com mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

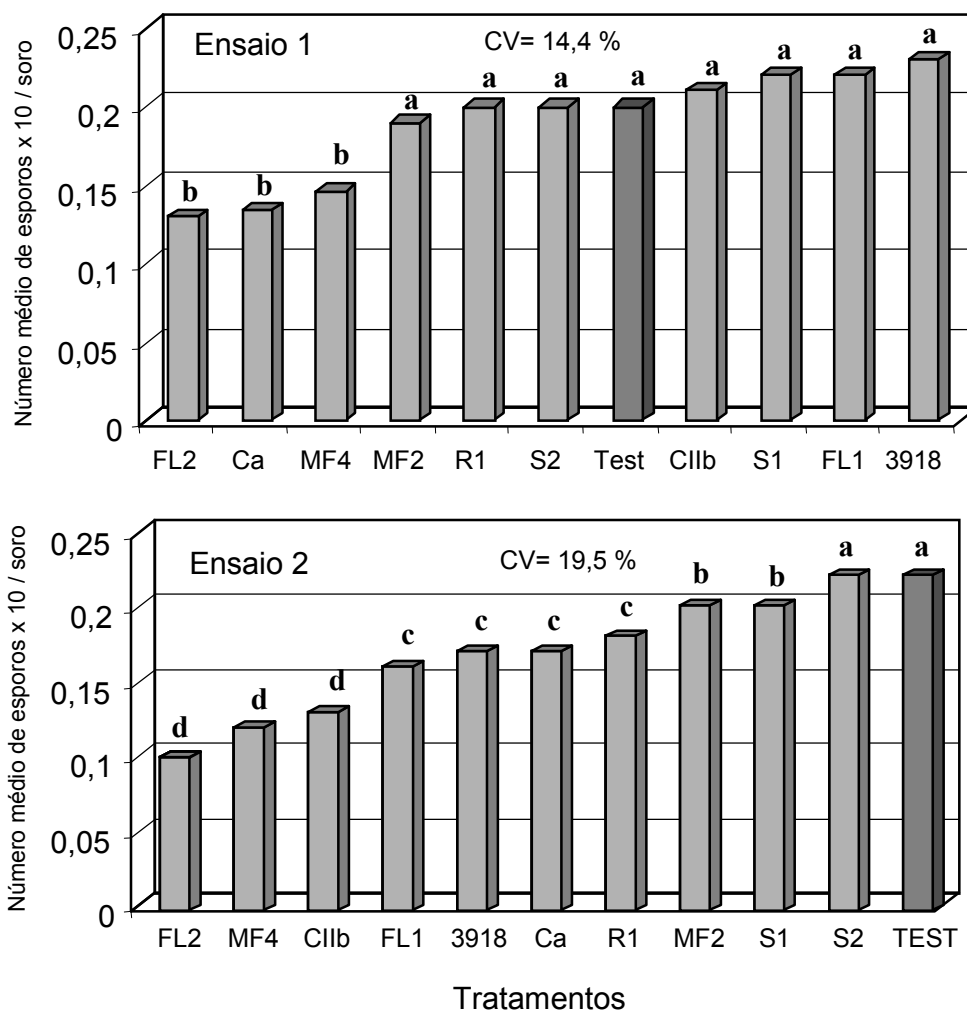


Figura 3 - Número médio de esporos de ferrugem por soro presentes em folhas de mudas de eucalipto tratadas com rizobactérias em dois ensaios realizados em câmara de crescimento. Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.2. Efeito do tempo decorrente entre tratamento com rizobactéria e inoculação do patógeno na indução de resistência

Os dois isolados testados diferiram significativamente da testemunha quanto as variáveis avaliadas nos dois tempos de tratamentos testados. A redução na severidade foi muito mais acentuada quando as mudas foram enraizadas em substrato tratado com rizobactérias, 80 dias antes da inoculação do patógeno (Figura 4).

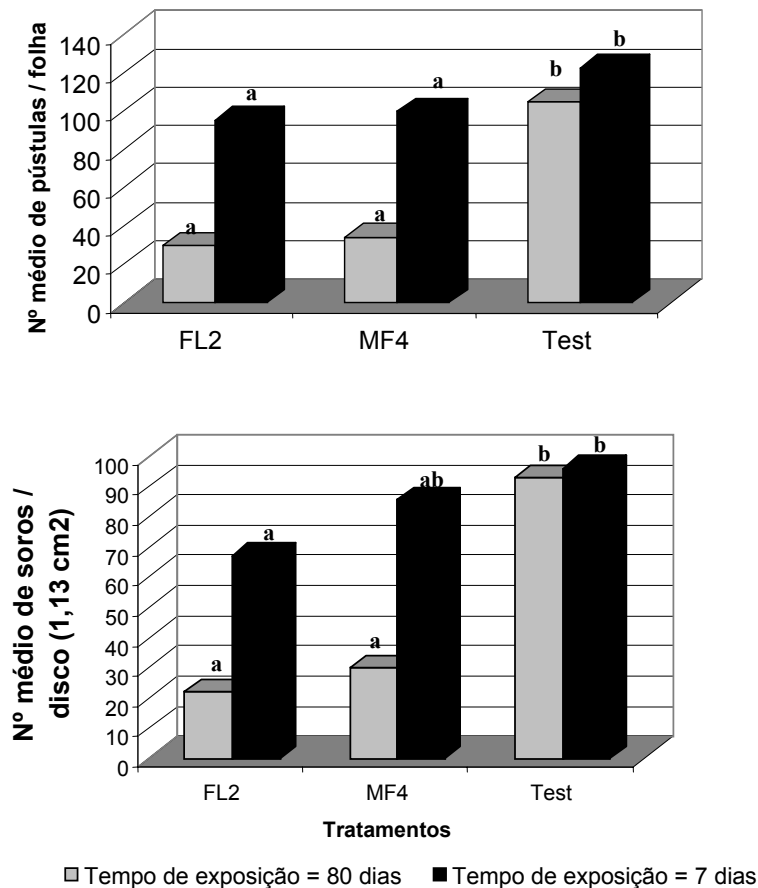


Figura 4 - Número médio de pústulas e de soros de ferrugem por área foliar ($1,13 \text{ cm}^2$) presentes em folhas de mudas de eucalipto tratadas com rizobactérias em dois períodos antes da exposição ao patógeno, 80 dias ou 7 dias antes. Para um mesmo tempo de exposição, médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV= 19,5 % e 22,3 para 80 ou 7 dias de exposição, respectivamente.

3.3. Indução de resistência à mancha de *Cylindrocladium candelabrum*.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto à redução da severidade da mancha de *Cylindrocladium*.

4. DISCUSSÃO

Alguns isolados de rizobactérias promotoras de crescimento em eucalipto podem induzir resistência sistêmica à ferrugem em *Eucalyptus* spp. Dos 10 isolados testados, FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*) e MF4 (*Pseudomonas* sp.) se destacaram em reduzir a severidade da doença. Isolados de *Pseudomonas* spp., em especial os do grupo fluorescente, são frequentemente relatados como indutores de ISR em culturas agrônomicas (MAURHOFER et al., 1994, VAN LOON et al, 1997). Na área florestal, ENEBACK e CAREY (2000) sugeriram que isolados de *Bacillus* sp. induzem resistência sistêmica à ferrugem (*Cronartium quercum* f. sp. *fusiforme*) em *Pinus* spp. A separação espacial entre o agente indutor de resistência e o patógeno, rizosfera e filosfera, respectivamente, é um indicativo do envolvimento de mecanismos de resistência induzida. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que algum sinal bioquímico produzido pelo agente indutor seja absorvido pela planta e se desloque até a parte área onde irá atuar (ROMEIRO, 1999). STEINER e SCHONBECK (1995) propuseram alguns critérios básicos para investigar a existência de resistência sistêmica induzida, entre eles a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência. Para os dois isolados testados, observou-se uma redução na severidade de ferrugem mesmo no menor tempo testado (1 semana). No entanto, essa redução foi bem mais acentuada quando as mudas foram produzidas em substrato rizobacterizado. Segundo VAN

LOON *et al.* (1998) é necessário haver um intervalo mínimo entre o tratamento com rizobactéria e inoculação do patógeno para que a planta entre em estado de indução e a resistência sistêmica se expresse. Em geral, com plantas anuais, esse tempo é de um semana. No entanto, ENEBACK e CAREY (2000) observaram resistência sistêmica induzida à ferrugem (*Cronartium quercum* f. sp. *fusiforme*) por isolados de PGPRs em *Pinus* spp., decorridas quatro semanas entre tratamento com indutor e inoculação com basidiósporos do patógeno. Pode ser que, no caso de plantas perenes como eucalipto e pinus, seja necessário um tempo maior que o observado nas plantas anuais para que a resistência seja plenamente manifestada. Os resultados desse trabalho mostraram uma maior eficiência na indução à resistência sistêmica à ferrugem em eucalipto decorrido um maior tempo entre exposição das plantas ao possível indutor e ao patógeno.

Vários tipos de respostas ativas poderiam ser induzidas nas plantas para impedir o desenvolvimento do patógeno, dentre estas o acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese (PRs) nos espaços intercelulares e nos vacúolos, lignificação e formação de papilas (VAN LOON *et al.*, 1998). Estudos histológicos, bioquímicos e fisiológicos buscando detectar algumas dessas modificações nas plantas tratadas com os isolados de rizobactérias podem fornecer um maior embasamento para se explicar melhor a expressão da resistência. Técnicas de fluorescência e imunofluorescência podem auxiliar bastante nos estudos histológicos.

Não se observou efeito dos tratamentos com rizobactérias no tamanho das lesões causadas por *Cylindrocladium candelabrum*. Na maioria dos casos, a resistência induzida é inespecífica e atua contra uma ampla gama de patógenos. No entanto, o método de inoculação do patógeno utilizado neste ensaio pode ter sido muito drástico, o que não impossibilitou a manifestação da resistência. É possível que inoculação com esporos seja mais eficiente para detectar esses efeitos. Recomenda-se testar a indução de resistência contra outros patógenos foliares de eucalipto, tais como *Mycosphaerella* spp., *Phaeophleospora epicoccoides*, *Sporothrix eucalypti* e bactérias fitopatogênicas.

Trabalhos futuros buscando-se determinar o tempo que essa resistência permanece efetiva, bem como a sua atuação sobre outros patógenos foliares,

devem ser conduzidos e podem explicar melhor o papel desses isolados na indução de resistência em minicepas de eucalipto. A obtenção de minicepas com resistência sistêmica à ferrugem pode ser muito importante no manejo dessa doença nos viveiros florestais, propiciando a diminuição ou até redução do uso de fungicidas, bem como aumentar a disponibilidade de brotos aptos a serem utilizados no enraizamento. Outro fator a considerar é a possibilidade de que os brotos coletados nessas mudas possam apresentar uma maior proteção também contra patógenos causadores de podridão de estacas, quando expostos às condições de enraizamento, o que o possibilitaria uma maior facilidade também no manejo dessa doença. Além disso, não podemos descartar a possibilidade dos isolados bacterianos atuarem como antagonistas por meio de outros mecanismos de biocontrole, como antibiose ou produção de sideróforos, o que poderia ser potencializado com uma ou mais aplicação dos isolados nas miniestacas e no substrato de enraizamento.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Mudas com cerca de 80 dias de idade, previamente enraizadas em substrato tratado com as rizobactérias, foram testadas quanto à resistência à ferrugem do eucalipto e à mancha-de-*Cylindrocladium*, em câmaras de crescimento (22°C/ fot. 12 h). Utilizou-se um DIC com 4 repetições, cada uma delas com 3 plantas, para ferrugem, ou com cinco para *Cylindrocladium*. Após 13 dias da inoculação, avaliou-se o número médio de pústulas/ folha, número de soros/ amostra e o número médio de esporos produzidos/ soro. Na avaliação da mancha de *Cylindrocladium candelabrum*, mediu-se apenas o tamanho da lesão ao oitavo dia após a inoculação, visto a mesma ter sido feita utilizando-se discos de micélio. Os isolados FL2 e MF4 foram bastante eficientes na redução da severidade da ferrugem, no entanto, o mesmo efeito não foi observado para *C. candelabrum*. Além disso, o tratamento das mudas com rizobactérias apenas uma semana antes da inoculação com *P. psidii* foi menos eficiente em reduzir a severidade da doença do que o tratamento em que foram utilizadas mudas enraizadas com as bactérias.

Estes resultados indicam que rizobactérias promotoras de enraizamento em eucalipto podem apresentar a vantagem extra de induzir uma maior resistência à doenças foliares, permitindo a obtenção de minicepas de melhor qualidade e diminuindo a necessidade de aplicação de fungicidas.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Dos 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, testados quanto ao seu potencial promotor no enraizamento de estacas de *Eucalyptus*, dez destacaram-se como excelentes indutores, propiciando ganhos de até 110% no enraizamento médio e de até 250% no peso de raiz. Esses isolados também foram eficientes no enraizamento de miniestacas, cujos ganhos variaram de acordo com o clone e isolado testados. Não se observou interação isolado-substrato, sendo que o substrato à base de composto de casca de arroz carbonizada foi muito superior, quanto a porcentagem de enraizamento e a massa de raízes. Esses isolados foram também testados quanto à capacidade de indução de resistência em mudas de eucalipto enraizadas em substrato tratado com os mesmos. Dois isolados foram bastante eficientes na redução da severidade da ferrugem, no entanto, o mesmo efeito não foi observado para *Cylindrocladium candelabrum*. Com o tratamento das mudas com rizobactérias apenas uma semana antes da inoculação com *Puccinia psidii*, obteve-se redução na severidade da doença muito menor do que a observada nas mudas enraizadas em substrato tratado com bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M.A.B., GAGNÉ, S., ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and the incidence of plant growth promoting rhizobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.194-199. 1995.
- ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: I CONFERÊNCIA IUFRO SOBRE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 1997. **Anais...** Salvador, BA: EMBRAPA-CNPQ, 1997. p.300-304.
- ASSIS, T.F., ROSA, O.P., GONÇALVES, S.I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, Nova Prata, 1992. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p.824.
- BALDANI, V.L.D., DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biol. Biochem.**, v.12, p.433-439. 1980.
- BETTIOL, W., AUER, C.G., CAMARGO, L.E.A., KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. **Summa Phytopatologica**, v.14, p.210-218. 1988.
- BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.12, p.181-197. 1974.
- BURNS, J.A., SCHWARS, O.J. Bacterial stimulation of adventitious rooting on in vitro cultured slash pine seedling explants. **Plant Cell Reports**, v.15, p.405-408. 1996.
- BURR, T.J., CAESAR, A. Beneficial Plant Bacteria. **Critical Rev. in Plant Sci.**, v.2, p.1-20. 1984.

- BURR, T.J., SCHROTH, M.N., SUSLOW, T. Increased potato yield by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v.68, n.9, p.1377-1383. 1978.
- CAESAR, A.J., BURR, T.J. Growth promotion of apple seedlings and root stocks by specific strains of bacteria. **Phytopathology**, v.77, n.11, p.1583-1588. 1987.
- CAMPELLO, F.B.B. **Controle biológico de *Cylindrocladum scoparium*, agente causal do tombamento de mudas de *Eucalyptus* spp., com bactérias antagonistas**. Recife, PE:UFRPE, 1992. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1992.
- CAMPINHOS, E., IKEMORI, Y.K. Introdução de novas técnicas na produção de mudas de essências florestais. **Silvicultura**, v.8, n.28, p.226-228, 1983.
- CHANWAY, C.P., HOLL, F.B. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, n.11, p.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. Influence of soil biota on Douglas-fir *Pseudotsuga Menziessi* seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.1025-1031. 1992
- 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.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: ACTAS DE SIMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FORESTALES, I, Buenos Aires, 1987. **Anais...**: CIEF, v.1, 1987. p.215-223.
- CHEN, Y, MEI, R., LU, S., LIU, L., KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKEHDE, R.S., GUPTA, V.K. (eds.) **Management of soil borne diseases**. New Delhi: M/S Narosa Publishing House, 1996.
- CHET, I., ORDENTLICH, A., SHAPIRA, R., OPPENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.129, p.85-92. 1990.
- CHET, I., INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.48, p.37-43. 1994.

- COOK, R.J., BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogen**. St. Paul: APS Press, 1983. 359 p.
- COSTACURTA, A., VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.1, p.1-18. 1995.
- DATTA, M., BANIK, S., GUPTA, R.K. Studies on efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizers *Bacillus firmus* in augmenting 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., KAHR, G., KEEL, C., VOISARD, C., WIRTHNER, P.H., WUTHRICH, B. Suppression of black root rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain: Potential applications and mechanisms. In: **Biological control of soilborne plant pathogen** (ed.) HORNBY D., Wallingford: CAB International, 1990. p.93-108.
- DEWAULLE, J.C. Produção massal de estacas enraizadas de *Eucalyptus* na República do Congo. **Silvicultura**, v.8, n.32, p.779. 1983.
- 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.
- DOWLING, D.N., O' GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends Biotechnol.**, v.12, p.133-141. 1994.
- DUBEIKOVSKY, A.N., MORDUKHOVA, E.A., KOCHETKOV, V.V., PLOKARPOVA, F.Y., BORONIN, A.M. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic-acid. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.1277-1281. 1993.
- ENEBACK, S.A., WEI, G., KLOEPPER, J.W. Effects of PGPR on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v.44, n.1, p.139-144. 1998.
- ENEBACK, S.A., CAREY, W.A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.306-308. 2000.
- FRAVEL, D.R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**. v.26, p.75-91. 1988.
- FROMMEL, M.I., NOWAKI, J., LAZAROVITS, G. Treatment of potato tuber with a growth promoting *Pseudomonas* sp: Plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v.150, p.51-60. 1993.
- GARBAYE, J. Helper bacteria: A new dimension to mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.128, p.197-210. 1994

- 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**, v.32, p.272-289. 1996.
- GAUDIN, V., VRAIN, T., JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.32, p.11-28. 1994.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.109-117. 1995.
- GLICK, B.R., PENROSE, D.M., JIPING LI. A model for lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J. Theor. Biol.**, v.190, p.63-68. 1998.
- GLICK, B.R., PATTEN, C.L., HOLGUIN, G., PENROSE, D.M. **Biochemical and genetics mechanisms used by PGPR**. Ontario, Canadá: ICP, 1999. 267p.
- 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. **Isr. J. Plant Sci.**, v.44, p.37-41. 1996.
- HAMMER, P.E., HILL, D.S., LAM, S.T., VAN PÉE, K.H., LIGON, J.M. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2147-2154. 1997.
- HOITINK, H.A., FAHY, P.C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.93-114. 1986.
- HUTCHINSON, C.R., FUJI, I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.201-238. 1995.
- JUNGHANS, D.T. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV, 2000. 44p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- KADO, C.I., HESKETT, M.S. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976. 1970.
- KATSY, E.I. Participation of auxins in regulation of bacterial and plant gene expression. **Russian. J. Genet.**, v.33, p.463-473. 1997.
- KING, E.O., WARD, M.K., RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.**, v.44, n.2, p.301-307. 1954.

- KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: INT. CONF. PLANT PATH. BACT, 4. 1978. **Proceedings...** INRA, 1978. p.879-882.
- KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N. Relationship of in antibiosis of plant growth- promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v.71, n.10, p.1020-1024. 1981.
- KLOEPPER, J.W. Effect of seedpiece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. **Phytopathology**, v.73, n.2, p.217-219. 1983.
- KLOEPPER, J.W., LEONG, J., TEINTZE, M., SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886. 1980.
- KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., KUC, J.A. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science Technology**, v.2, p.349-351. 1992.
- 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**, v.147, p.81-83. 1994.
- LEONG, J. Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209. 1986.
- LIFISHITZ, 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.
- LOPER, J.E., NOVAK-THOMPSON, B., WHISTLER, C.A., HAGEN, M.J., CORBELL, N.A., HENKELS, M.D., STOCKOWELL, 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.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-50, 1996.
- MAHAFFE, 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**. Austrália, Victoria: CSIRO, 1994. p. 23-31.

- MARIANO, R.L.R., ASSIS, S.M.P. Quantificação de inóculo de bactéria fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. (coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Pernambuco: UFP, 2000. p. 49-52.
- MAURHOFER, M., HASE, C., MEUWLY, P., METRAUX, J.P., DÉFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root colonizing *P. fluorescens* strain CHAO. **Phytopathology**, v.84, p.139-146. 1994.
- MAYAK, S., TIROSH, T., GLICK, B.R. The influence of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 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.
- MELO, I.S., SANHUEZA, R.M. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**: manual técnico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 1995. 72p.
- 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. 1998. p.86-116.
- MOHAMMAD, G., PRASSAD, R. Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in polypotted *Eucalyptus calmadulensis* seedlings. **J. Trop. For.**, v.4, p.74-77. 1988.
- MOORES, J.C., MAGAZIN, M., DITTA, G.S., LEONG, J. Cloning of genes involved in the biosynthesis of pseudobactin, a high-affinity iron transport agent of a plant growth promoting *Pseudomonas* strain. **J. Bacteriol.**, v.157, p.53-58. 1984.
- O'SULLIVAN, D.J., MORRIS, J., O'GARA, F. Identification of an additional ferric-siderophore uptake gene clustered with receptor, biosynthesis, and fur-like regulatory genes in fluorescent *Pseudomonas* sp. Strain M114. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p.2056-2064. 1990.
- PAULITZ, T.C., BAKER, R. Control of *Pythium* damping-off of cucumber with *Pythium nunn*: influence on soil environmental and organic amendments. **Phytopathology**, v.77, p.341-346. 1987.
- PENCHEL, R.M., NEVES, D.C., CAMPINHOS, C.N. Otimização de parâmetros fisiológicos da propagação vegetativa por estaca de matrizes elites de eucalipto. IN: Anais 5º Congresso de Fisiologia Vegetal. Lavras: Sociedade Brasileira de Fisiologia vegetal, 1995, 1p. (resumo).
- PRIKRYL, Z., VANCURA, V., WURST, M. Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. **Biologia Plantarum**, v.27, p.159-163. 1985.

- RAJ, J., BAGYARAJ, D.J., MANJUNATH, A. Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular mycorrhiza and a phosphate dissolving bacterium on plant growth and ^{32}P -uptake. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.105-108. 1981.
- ROMEIRO, R.S. **Correlação entre turbidez e número de células viáveis em uma suspensão bacteriana**. Viçosa.1996. (Apostila de aula FIP 640).
- ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV. 1999. 45p. (Cadernos didáticos, 56)
- ROVIRA, A.D. Plant exsudates. **Bot. Rev.**, v. 35, p. 35-37. 1969.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., VALE, F.X.R. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, do fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, n.1, p.55- 61. 1989.
- SARNIGUET, A., KRAUS, J. HENKELS, M.D., MUEHHLCHEN, A. M., LOPER, J.E. The sigma factor affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.12255-12259. 1995.
- SCHER, F. M., KLOEPPER, J.W., SINGLETON, C.A. Chemotaxis of florescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates in vitro and in soil. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.570-574. 1985.
- SCHNIDWER, U., KEEL, C., BLUMER, C., TROXLER, J., DÉFAGO, G., HAAS, D. Amplification of the housekeeping sigma factor in *P. fluorescens* CHAO enhances antibiotic production and improvies biocontrol abilities. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.5387-5392. 1995.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.339-358. 1987.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., VAN PEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN producing pseudomonas on rhizosphere interactions. In: KEISTER, D.L., CREGAN, P.B. (ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordecht: Kluwer Academic Publ., 1991. p.211-220.
- SCHROTH, M.N., HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.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**, v.21, n.6, p.1295-1302. 1986.
- 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**, v.21, p.109-119. 1996.
- SHISHIDO, M., CHANWAY, C.P. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth promoting *Pseudomonas*. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p. 22-31. 1999.
- SIQUEIRA, J.O, FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS. 1988. 235p.
- SIQUEIRA, J.O. **Biologia do solo**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1993. 230p.
- SRINIVASAN, M., PETERSEN, D.J., HOLL, F.B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1006-1014. 1996.
- STEINER, U., SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monoct. In:HAMMERSCHMIDT, R., JOSEPH KUC (eds). **Induced resistance to disease in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., v.4, p. 47-63. 1991.
- 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.
- VALLINI, G., PERA, A., VALDRIGHI, M., GIOVANNETTI, M. Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms and mycorrhizal fungi. **Bio. Fertil. Soils**, v.16, p.1-4. 1993.
- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H. M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483. 1998.
- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: INT. WORKSHOP ON PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 4. 1997. **Proceedings...**, Sapporo, Japan, p.50-57. 1997.
- VAN PEER, R., NIEMANN, G.J., SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734. 1991.
- WEI, G., KLOPPER, J.W., TUZUN, S. Introduction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of PGPRs. **Phytopathology**, v.81, p.1508-1512. 1991.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.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**, v.102, p.717-724. 1993.