

JULIANA MARGARIDO FONSECA COUTO BRUNETTA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA A PRODUÇÃO DE  
MUDAS DE *Pinus* spp.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B895i  
2006

Brunetta, Juliana Margarido Fonseca Couto, 1974-  
Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção  
de mudas de *Pinus* spp. / Juliana Margarido Fonseca  
Couto Brunetta. – Viçosa : UFV, 2006.  
xi, 57f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Mauro Gomes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.  
2. Rizobactérias - Isolamento. 3. Rizobactérias - Seleção.  
4. Pinheiro - Mudas. 5. *Pinus taeda*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.91146

JULIANA MARGARIDO FONSECA COUTO BRUNETTA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA A PRODUÇÃO DE  
MUDAS DE *Pinus* spp.**

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

APROVADA: 21 de julho de 2006.

---

Prof. Acelino Couto Alfenas  
(Co-orientador)

---

Prof. Wantuelfer Gonçalves  
(Co-orientador)

---

Prof. Ésio de Pádua Fonseca

---

Pesq. Eli Sydnei Lopes

---

Prof. José Mauro Gomes  
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Laércio Couto e Maria José Margarido Fonseca Couto.

Ao meu esposo, Givanildo Brunetta.

Aos meus irmãos, Luciano e Michelle.

A todos os meus familiares e amigos.

## AGRADECIMENTO

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de pesquisa concedidas durante o período de pós-graduação e estágio no exterior.

Aos engenheiros florestais Adriano Emanuel Amaral de Almeida, Rogério Silva e José Antônio Rezende, da Klabin Paraná Papéis, *International Paper* do Brasil e Duratex Florestal S.A., respectivamente, pela doação de sementes e mudas de *Pinus*.

Ao professor José Mauro Gomes, pela orientação.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela amizade.

Aos professores Wantuelfer Gonçalves, Ézio de Padua Fonseca e Dr. Eli Sidney Lopes, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Aos amigos Reginaldo Gonçalves Mafía e Daniel Breda Binoti, pela imensa ajuda, paciência e amizade.

Aos professores Kenneth Lee McNabb, Scott Enebak e Willian Carey (*in memoriam*), pelos ensinamentos, e aos colegas Tommy Hill, Humberto Zeraib, Júlia Hermeto e André Boz, pela amizade e pelo apoio durante o período de estágio na Auburn University, USA.

A toda minha família, em especial às tias Zilda Maria Fonseca e Nilva Nicolao Fonseca, pelo apoio e pela ajuda incondicional.

À querida Márcia Maria Brandão, pela ajuda e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação ao trabalho.

A todos os colegas e funcionários do laboratório de Fitopatologia e do Viveiro de Pesquisas do DEF, pela amizade, pelo convívio e pela colaboração.

Finalmente, a todos que, de alguma forma, fizeram parte de mais uma etapa de minha vida.

## **BIOGRAFIA**

JULIANA MARGARIDO FONSECA COUTO BRUNETTA, filha de Laércio Couto e Maria José Margarido Fonseca Couto, nasceu a 12 de dezembro de 1974, em Itararé, Estado de São Paulo.

Graduou-se no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em 2000. No mesmo ano, iniciou o Mestrado no mesmo departamento, sob a orientação do professor Antônio Lelis Pinheiro, defendendo a dissertação em abril de 2002. Iniciou o curso de Doutorado na mesma instituição e departamento, em agosto de 2002, sob orientação do professor José Mauro Gomes, defendendo a tese em julho de 2006.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Rizobactérias promotoras de crescimento .....	3
2.2. Rizosfera .....	3
2.3. As rizobactérias e a promoção de crescimento.....	4
2.4. Colonização de raiz.....	6
2.5. Interação das rizobactérias e simbioses.....	7
2.6. Colonização endofítica .....	8
2.7. Produção de fitormônios.....	9
2.8. Controle biológico .....	10
2.8.1. Produção de antibióticos, hidrocianetos, enzimas e substâncias voláteis.....	10
2.8.2. Produção de sideróforos .....	11
2.8.3. Indução de resistência sistêmica.....	11
2.8.4. Competição por espaço e nutrientes .....	12
2.8.5. Especificidade bactéria/planta .....	12
3. OBJETIVOS GERAIS .....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
<b>ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE <i>Pinus taeda</i> .....</b>	<b>24</b>
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	24
1. INTRODUÇÃO .....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1. Isolamento de rizobactérias.....	25

	Página
2.2. Seleção dos isolados de rizobactérias .....	26
2.3. Avaliações, delineamento experimental e análises estatísticas.....	27
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÕES .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE RIZOBACTÉRIAS</b>	
<b>ISOLADAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Pinus sp.</i>.....</b>	<b>37</b>
RESUMO .....	37
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1. Espécies e procedências das sementes de pinus.....	39
2.2. Rizobactérias testadas .....	39
2.3. Produção de inóculo e rizobacterização do substrato .....	39
2.4. Semeadura, adubação do substrato e condução do experimento .....	40
2.5. Delineamento experimental .....	41
2.6. Obtenção e análise dos dados.....	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Especificidade dos isolados de rizobactérias .....	41
4. DISCUSSÃO .....	44
5. CONCLUSÕES .....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
<b>COLONIZAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR</b>	
<b>RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE RAÍZES DE MUDAS DE <i>Pinus</i></b>	
<b><i>taeda</i>.....</b>	<b>49</b>
RESUMO .....	49
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO .....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
2.1. Colonização de raízes.....	51
2.2. Solubilização de fosfato .....	52
3. RESULTADOS.....	52
4. DISCUSSÃO .....	54
5. CONCLUSÕES .....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
5. ANEXOS.....	57

## RESUMO

BRUNETTA, Juliana Margarido Fonseca Couto, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp.** Orientador: José Mauro Gomes. Co-Orientadores: Acelino Couto Alfenas e Wantuelfer Gonçalves.

Os objetivos deste trabalho foram isolar e selecionar rizobactérias promotoras de crescimento de *Pinus taeda*, bem como verificar a especificidade destas para diferentes espécies de pinus (*P. taeda*, *P. elliottii*, *P. oocarpa* e *P. caribaea hondurensis*). Foram determinadas também a capacidade de solubilização de fosfato de isolados de rizobactérias selecionados e a colonização desses nas raízes das mudas das diferentes espécies de *Pinus*. Os isolados das rizobactérias foram obtidos de mudas de 150 dias de idade e a seleção das rizobactérias foi feita por meio da inoculação dos isolados em substrato comercial usado para produção de mudas. Após 150 dias de semeadura, avaliaram-se as variáveis morfológicas como altura da parte aérea, peso de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e o índice de qualidade de Dickson (IQD). O valor do IQD estabelecido como padrão para o estudo foi de 0,20. Na seleção dos isolados, para a variável peso de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular das mudas das diferentes espécies, foram observadas diferenças significativas com relação às mudas-testemunha nos isolados 12 e 19, respectivamente. Quanto ao índice de qualidade de Dickson, constataram-se diferenças significativas entre as mudas-testemunha e as crescidas sobre os isolados UFV-D6, UFV-A3, UFV-C4, UFV-F4, UFV-E2 e UFV-B3, porém com valores abaixo do estabelecido como padrão no estudo. Dos 99 isolados

testados, seis, UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 e UFV-G4, foram selecionados por estimular o crescimento e melhorar a qualidade das mudas de *P. taeda*. Para a segunda etapa, esses seis isolados selecionados, bem como os isolados UFV-X2, UFV-Z1 e UFV-F6, foram utilizados nos testes para as demais espécies de pinus. O peso de matéria seca da parte aérea e de raízes e o índice de qualidade de Dickson (IQD) foram avaliados 150 dias após a semeadura. Foi constatada diferença significativa dos isolados UFV-AM5 e UFV-Z1 para o *P. taeda*, quanto ao peso de matéria seca da parte aérea e sistema radicular e ao índice de qualidade de Dickson. Para essas variáveis, foram observados também resultados positivos para as mudas de *P. elliottii*, destacando-se os isolados UFV-AM5, UFV-X2 e UFV-G2. De modo geral, pode-se concluir que existe especificidade dos isolados para diferentes espécies de pinus, indicando que as melhores médias para todas as variáveis foram para as mudas de *P. taeda*. Para observar a capacidade de colonização das rizobactérias, sementes de *P. taeda* foram microbiolizadas com os isolados de rizobactérias pré-selecionados na primeira etapa deste trabalho. A avaliação foi realizada visualmente aos 30 dias da semeadura. Todos os nove isolados testados apresentaram capacidade de colonização *in vitro* de raízes, porém apenas o isolado UFV-AM5 foi capaz de solubilizar fosfatos *in vitro*.

## ABSTRACT

BRUNETTA, Juliana Margarido Fonseca Couto, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2006. **Rhizobacteria isolation and selection for *Pinus* spp. seedlings production.** Adviser: José Mauro Gomes. Co-Advisers: Acelino Couto Alfenas and Wantuelfer Gonçalves.

The objectives of this research were to isolate and select *P. taeda* growth promoting rhizobacterias and test the especificity of *P. taeda* strains on different pinus species (*P. elliottii*, *P. oocarpa* e *P. caribaea hondurensis*). Their capacity of colonizing *P. taeda* roots germinated *in vitro* and their ability to solubilize phosphates were also determinated. The bacterias were isolated from 150 day-old *Pinus* seedlings and the selection was carried out by the strains inoculation in comercial substract used for seedling production. After 150 days of sowing, the morphological variables as aerial part height, aerial part and root system dry matter, and Dickson's quality index (DQI) were evaluated. The DQI standard value used in his research was 0,20. In the strains selection, significantly differences were observed for the aerial part and root system dry matter weight for the different seedling species with relationship to the isolated control seedlings 12 and 19, respectively. In relation to Dickson's quality index, significantly differences were verified between the control seedlings and the ones grown on the strains UFV-D6, UFV-A3, UFV-C4, UFV-F4, UFV-E2 e UFV-B3, but with values below to that established as pattern in the study. From the 99 tested strains, six were selected (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 and UFV-G4) due to their capacity of stimulating the growth and quality improvement of *P. taeda* seedling.

On the second part of the research, those six selected strains, as well as the strains UFV-X2, UFV-Z1 and UFV-F6, were used to test other species of pinus. The aerial part and roots dry matter weight and Dickson's quality index were evaluated after 150 days of sowing. The strains UFV-AM5 and UFV-Z1 presented significantly differences for *P. taeda* in relation to the aerial part and root system dry matter weight, and for Dickson's index quality. These variables also presented positive results at the *P. elliottii* seedlings, especially the strains UFV-AM5, UFV-X2 and UFV-G2. In general, it was possible to conclude that there is strain especificity for the different pinus species, indicating that *P. taeda* seedlings had the best averages for all the variables. To observe the rhizobacteria colonization capacity, *P. taeda* seeds were microbiolized with rhizobacteria pre-selected strains on the first part of this research. The evaluation was accomplished visually on the 30<sup>th</sup> day of sowing. All the nine tested strains were able to colonize the roots *in vitro*, but only the strain UFV-AM5 was efficient on phosphates solubilization.

## 1. INTRODUÇÃO

O pinus foi introduzido no Brasil na década de 1950 e conta atualmente com uma área plantada de aproximadamente 2.220.000 ha (FAO, 2006), concentrada principalmente no Sul e Sudeste, visando a produção de madeira para celulose, a fabricação de móveis, chapas e placas e a produção de goma-resina.

No Brasil, a qualidade de mudas tem sido discutida desde a década de 1980, principalmente no que se refere a mudas de espécies exóticas. Embora as técnicas de viveiro de espécies florestais exóticas tenham evoluído muito nos últimos anos, observa-se ainda deficiência em se estabelecer um padrão de qualidade de mudas de pinus, o que pode resultar em baixa sobrevivência pós-plantio e crescimento inicial. Além disso, a longa permanência das mudas no viveiro pode aumentar os custos de produção e a possibilidade de ocorrência de doenças.

Por isso, novas tecnologias devem ser testadas, a fim de otimizar a produção e obter mudas de alto padrão de qualidade. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas tem possibilitado o aumento substancial do crescimento de mudas e a minimização das perdas por doenças (HOLL; CHANWAY, 1992; LEYVAL; BERTHELIN, 1993).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são microrganismos que vivem associados à rizosfera e que podem ser importantes para a sanidade e nutrição da planta (MARSCHNER, 1995; KLOEPPER, 1996).

Na rizosfera existem rizobactérias em abundância, organizadas em microcolônias. Algumas dessas rizobactérias não apenas se beneficiam dos nutrientes secretados

pelas raízes, como também influenciam o crescimento das plantas de forma direta ou indireta (RAINEY, 1999; LUGTENBERG, 2001; BLOEMBERG).

Por várias décadas tem-se estudado o efeito da aplicação de rizobactérias no solo com o objetivo de aumentar o crescimento das plantas por meio de mecanismos que aumentem a fixação de nitrogênio e protejam a planta de ferimentos causados por geadas (PROBANZA et al., 2001). Os mecanismos de ação de rizobactérias ainda não estão totalmente elucidados, mas suportam a hipótese de indução do crescimento (ALSTRÖM, 1994), resistência a doenças (KUMAR, 1998), mineralização de matéria orgânica (BRITO ALVAREZ et al., 1995), aumento da disponibilidade de nutrientes (AMARAL; DAHDOH, 1997; FREITAS et al., 1997) e mudanças benéficas no balanço hormonal da planta (CHANWAY; NELSON, 1991; KODA, 1992; GUTIERREZ MANERO et al., 1996).

A utilização de rizobactérias benéficas na produção de mudas oferece a possibilidade de aliar os ganhos obtidos na qualidade de mudas com o aumento da sobrevivência das mudas pós-plantio. A obtenção e utilização de rizobactérias isoladas a partir de espécies arbóreas, principalmente de *Pinus*, são escassas, porém de grande importância, visto que a especificidade bactéria/planta diminui com a inoculação de bactérias isoladas de plantas do mesmo gênero. Sendo assim, o presente estudo possibilitou isolar e selecionar rizobactérias promotoras do crescimento de *P. taeda* L.; determinar o grau de especificidade de rizobactérias isoladas de mudas de *P. taeda* para diferentes espécies de pinus; avaliar o efeito de isolados promotores de crescimento sobre o padrão de qualidade de mudas de diferentes espécies de *Pinus* sp.; avaliar a capacidade de colonização das rizobactérias em raízes de mudas de *Pinus* sp.; e avaliar a solubilização de fosfatos inorgânicos pelas rizobactérias isoladas de mudas de *P. taeda*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Rizobactérias promotoras de crescimento

Os primeiros estudos com microrganismos que promovem crescimento de plantas ocorreram na União Soviética, utilizando *Bacillus* spp. e *Azotobacter chroococcum*, em 1895 e 1909, respectivamente (MISHUSTIN; NAUMOVA, 1963). No entanto, o interesse pelo estudo desses microrganismos se intensificou apenas a partir das décadas de 1960 e 1970, considerando seus efeitos no crescimento e no aumento da produção de plantas (BROWN, 1974). Desde então, grupos de pesquisadores de várias partes do mundo se concentraram nesse assunto (KLOEPPER, 1995; BOWEN; ROVIRA, 1999).

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas constituem um grupo de microrganismos que em inglês é denominado PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). O termo PGPR foi proposto pela primeira vez por Kloepper e Schroth (1978), para descrever bactérias que colonizam raízes e promovem o crescimento de plantas. As PGPRs também podem ser denominadas YIB (*Yield-increasing bacteria*), pois além de aumentar o crescimento resultam em maior produção (BOWEN; ROVIRA, 1999).

### 2.2. Rizosfera

Hiltner (1904), citado por Buchenauer (1998), definiu a rizosfera como sendo a zona ao redor das raízes de plantas contendo nutrientes liberados pelas raízes, as quais são colonizadas por microrganismos. A interação entre as bactérias da zona radicular e a

planta envolve eventos de colonização contínua, que vai desde a rizosfera até o rizoplasma, atravessa a epiderme e o apoplasto das raízes e vai direto para a parte aérea das plantas (PETERSEN et al., 1981; KLOPPER et al., 1992). O córtex radicular (endoraiz) é considerado uma parte do ambiente solo-raiz, evidenciando que a comunidade de bactérias especializadas da rizosfera é capaz de penetrar e colonizar tecidos radiculares, beneficiando outros órgãos da planta (DARBYSHIRE; GREAVES, 1973; OLD; NICOLSON, 1978; HALLMAN et al., 1997; STURTZ; NOWAK, 2000).

No ambiente específico da rizosfera ocorre trocas de energia e de nutrientes e sinais moleculares, fazendo com que essa seja química, bioquímica e biologicamente diferente do solo ao redor (VARANIMI; NANMIPIERI, 2003). A base de crescimento e atividade dos microrganismos na rizosfera se dá em função da constante liberação de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, vitaminas, hormônios e outras substâncias pelas raízes (CURL; TRUELOVE, 1986). Essa liberação pode ser afetada quantitativa e qualitativamente por vários fatores, como pela espécie e idade da planta, pelo tipo de solo, pela fertilidade do solo, pela luz, pela temperatura e pelo tratamento foliar (ROVIRA; DAVEY, 1974). Desta forma, a interface solo-raiz representa uma interação dinâmica entre microrganismos, raízes e constituintes do solo. Os compostos orgânicos são utilizados como fonte de energia e carbono pelos microrganismos, resultando assim em maior crescimento e atividade na região da rizosfera. O número de bactérias encontradas em volta das raízes é 10 a 100 vezes maior do que em outras partes do solo (LYNCH; WHIPPS, 1991).

Dentre os microrganismos presentes na rizosfera, as bactérias são as mais abundantes, podendo promover efeitos deletérios, benéficos ou neutros para plantas. As bactérias deletérias incluem os patógenos de plantas superiores, enquanto as benéficas incluem as saprófitas e os simbioses mutualistas, que desempenham papel importante nos agrossistemas e ecossistemas naturais (WELLER; THOMASHOW, 1994; NEHL et al., 1996).

### **2.3. As rizobactérias e a promoção de crescimento**

Como originalmente foram definidas por Kloepper e Schroth (1978), as rizobactérias colonizadoras de raízes são aquelas capazes de promover o crescimento de plantas e que podem atuar como agente de biocontrole.

Segundo Bloemberg e Lugtenberg (2001), as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) abrangem microrganismos que vivem em associação com raízes de plantas e estão abundantemente presentes na rizosfera, organizadas em microcolônias. Algumas dessas rizobactérias não apenas se beneficiam dos nutrientes secretados pelas raízes das plantas, mas também influenciam positivamente, seja de forma direta ou indireta, o crescimento de plantas.

Os efeitos indiretos ocorrem quando as bactérias protegem as plantas de microrganismos patogênicos por um ou múltiplos mecanismos, devendo ser ressaltado que a competição e a liberação de compostos antimicrobianos, como sideróforos (BURR; CAESAR, 1984; WELLER, 1985; KLOEPPER et al., 1991), antibióticos, enzimas e outras moléculas, podem suprimir populações de patógenos (SCHIPPERS et al., 1987; Van LOON; BAKKER, 2003).

Os efeitos diretos incluem fixação do nitrogênio atmosférico (CHANWAY; HOLL, 1991), solubilização de minerais, como o fósforo (WHIPPS, 1997), e produção de fitormônios, incluindo auxinas, citocininas e giberelinas (HOLL et al., 1988; DOBBELAERE et al., 2003). Alguns isolados de PGPR possuem vários mecanismos que podem influenciar o crescimento das plantas em várias etapas do seu ciclo de vida (GLICK et al., 1999). Além disso, as PGPRs interagem e favorecem a colonização das raízes por fungos micorrízicos, estimulando imediatamente o crescimento de plantas (MEYER; LINDERMAN, 1986; CHANWAY; HOLL, 1991)

A produção de hormônios e o seu impacto na morfogênese da raiz, com subsequente aumento da absorção do ferro, podem explicar grande parte dos efeitos positivos das rizobactérias no crescimento das plantas (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003). Há evidências de que as PGPRs podem aumentar a produção das plantas, controlar patógenos radiculares, induzir à resistência contra patógenos foliares, aumentar a nodulação em leguminosas e aumentar a emergência de plântulas (KLOEPPER et al., 1991; KLOEPPER, 1995).

As rizobactérias podem ser classificadas, de acordo com seus efeitos benéficos, como: i) bactérias biofertilizantes, que são aquelas fixadoras de nitrogênio utilizado pela planta, o que resulta em maior crescimento quando a quantidade de nitrogênio do solo é limitada; ii) bactérias fitoestimuladoras, promotoras do crescimento da planta através da produção de hormônios; e iii) agentes de biocontrole, capazes de proteger as plantas de microrganismos fitopatogênicos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001).

As PGPRs podem ser inoculadas em sementes, raízes, estacas ou no solo (BOWEN; ROVIRA, 1999). A expressão da promoção de crescimento pelas PGPRs pode ser quantificada na melhoria da germinação, na emergência de plântulas, no aumento de peso de matéria seca da raiz e da parte aérea, no comprimento de raiz e da parte aérea e na produção (WHIPPS, 1997).

#### **2.4. Colonização de raiz**

A colonização radicular por microrganismos é um fenômeno complexo e se encontra sob a influência de vários parâmetros. A determinação desses parâmetros mais importantes é feita principalmente através do estudo comparativo de estirpes mutantes e selvagens, em relação a uma característica que se acredita importante no processo de colonização. Desta forma, foram identificados genes de motilidade, produção de lipossacarídeos, síntese de moléculas de superfície celular, prototrofia de aminoácidos e vitaminas, produção de NADH, desidrogenase, enzimas envolvidas no rearranjo das moléculas de DNA e manutenção do pH interno (OLIVEIRA et al., 2003).

Segundo Graystone et al. (1998), a interação planta-microrganismo se estende no tempo (idade da planta), espaço (macro e microhabitat) e substrato (fonte de energia e disponibilidade). As plantas são capazes de influenciar a comunidade microbiana ao redor do seu sistema radicular por meio da exsudação seletiva de carboidratos, ácidos carboxílicos e aminoácidos específicos.

O primeiro passo no processo de colonização é o encontro físico entre a bactéria e a planta hospedeira, que pode ocorrer de forma passiva (transporte pela solução do solo) ou ativa (via mecanismos de motilidade do microrganismo ou crescimento das raízes). O movimento do microrganismos ocorre por quimiotaxia, que é um reconhecimento químico do gradiente de fonte de carbono, exsudado pelas raízes, existente entre o solo e a rizosfera (OLIVEIRA et al., 2003).

As rizobactérias após colonização das raízes, induzem a mudanças bioquímicas, evidenciando a co-evolução (BOLTON et al., 1993; MERHARG; KILLHAM, 1995; PARMAR; DAEDWAL, 1999). A partir do reconhecimento, a colonização pode ocorrer em duas etapas: por adsorção inicial (reversível) e por ancoramento dirigido por proteínas extracelulares de origem bacteriana (irreversível) (MICHIELS et al., 1991).

A rizosfera é colonizada especialmente por bactérias gram-negativas, principalmente *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (VANCURA, 1980), as quais apresentam

certas vantagens competitivas (HOWELL; STIPANOVIC, 1980; WELLER; COOK, 1983). Parke et al. (1986) estudaram mutantes de *Pseudomonas* e constataram que a prototropia por aminoácidos e vitamina B1, as altas taxas de crescimento e a utilização da matéria orgânica e de lipopolissacarídeos desempenham papel importante na habilidade de colonização de raiz.

Os nutrientes da rizosfera não afetam somente a colonização da raiz por saprófitas, mas também estimulam a colonização por organismos patogênicos, pois ocorre liberação de açúcares, aminoácidos e outros exsudatos (SCHROTH; HILDEBRANDT, 1964; MITCHELL, 1976). Sendo assim, as rizobactérias que geralmente são inoculadas nas sementes devem possuir a capacidade de se estabelecer na região da rizosfera, a uma densidade de população suficiente para produzir os efeitos benéficos.

No entanto, essas bactérias devem primeiro sobreviver na rizosfera, utilizar os nutrientes exsudados pelas raízes, proliferar, ser capazes de colonizar todo o sistema radicular e também de competir com outros microrganismos já existentes (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Acredita-se que o genótipo da planta pode influenciar a quantidade e a composição dos exsudatos radiculares, afetando a colonização, o tamanho da população e as atividades das rizobactérias (BUCHENAUER, 1998).

A concentração de bactérias diminui à medida que se aproxima da ponta da raiz, ficando até 100 vezes menor (CHIN A-WOENG et al., 1997). Após a colonização das sementes, o ideal é que as bactérias benéficas colonizem o máximo de raízes possíveis, e o sucesso da colonização pode ser avaliado com a habilidade das bactérias alcançarem a ponta da raiz após a colonização das sementes (LUGTENBERG; DEKKERS, 1999).

## **2.5. Interação das rizobactérias e simbioses**

As rizobactérias da rizosfera desempenham papel importante na nutrição da planta, tanto pela habilidade de liberar nutrientes minerais do solo quanto pela interação com micorrizas e outros simbioses (DE LEIJ; LYNCH, 1997).

Sabe-se que determinadas rizobactérias, em contato com fungos micorrízicos, são capazes de estimular a germinação de esporos, removendo os auto-inibidores mediante a produção de compostos voláteis. Além disso, com o maior crescimento e a

exsudação radicular, ocorre melhoria das condições para colonização dos fungos micorrízicos (AZCÓN-AQUILAR; BAREA, 1992; LINDERMAN, 1992).

Segundo Minerdi et al. (2002), a associação entre fungos micorrízicos e rizobactérias, particularmente as PGPRs, tem profundos efeitos na sanidade de plantas, que se dá através de sinergismos benéficos. Garbaye (1994) mostrou que alguns isolados de rizobactérias aumentavam a habilidade das raízes em estabelecer simbiose com fungos ectomicorrízicos, propondo uma nova categoria de bactéria, a MHB (*Micorrhization helper bacteria*). No entanto, a presença de bactérias dentro ou associadas a fungos ectomicorrízicos ainda requer estudos mais detalhados.

## **2.6. Colonização endofítica**

Segundo Sturz e Nowak (2000), as rizobactérias têm sido agrupadas em exobactérias (as que existem fora dos tecidos), ou em endobactérias (as que existem dentro dos tecidos), com base em sua função e em sua capacidade de conferir benefícios às plantas. Por outro lado, sabe-se que as bactérias endofíticas distribuem-se desde as raízes até a parte aérea, ou permanecem restritas às raízes (KIM et al., 1997). Além disso, a colonização em algumas partes da planta não é considerada absolutamente necessária para que ocorra o crescimento (DE WEGER et al., 1995).

As comunidades endofíticas podem modificar a morfologia e a estrutura da planta (BENHAMOU et al., 1996), influenciando a maneira como as exobactérias afetam o crescimento (STURZ; CHRISTIE, 1995; QUADT-HALLMAN et al., 1997).

A vantagem ecológica das bactérias endofíticas é que elas podem crescer e competir na rizosfera, mas podem também se desenvolver dentro das raízes, onde são protegidas da competitividade e do ambiente severo do solo (WHIPPS, 2001). As bactérias endofíticas podem colonizar sementes, raízes e tubérculos (MCINROY; KLOEPPER, 1995; STURZ et al., 1999) e também ocupar nichos específicos dentro dos tecidos das raízes, incluindo a camada externa do córtex, algumas células da epiderme, a camada interna do córtex, a endoderme e os tecidos vasculares (KLOEPPER et al., 1991).

A colonização da superfície de sementes e de raízes e a colonização endofítica são características consideradas desejáveis para o biocontrole (KLEIFELD; CHET, 1992; TOMBOLINI et al., 1999). Além disso, a habilidade da bactéria colonizar o interior das raízes tem sido considerada uma característica importante em vários sistemas que envolvem indução de resistência sistêmica. No entanto, a habilidade de

crescer na rizosfera não só torna a bactéria um agente promotor de crescimento, como também um agente de biocontrole (WHIPPS, 2001).

A interação entre bactéria endofítica e planta hospedeira ainda não está totalmente elucidada (HALLMANN et al., 1997; CHANWAY, 1998). Todavia, sabe-se que as bactérias endofíticas desempenham papel importante na nutrição da planta, principalmente nas associações entre rizóbios e leguminosas (STURTZ et al., 1999; SEVILLA et al., 2001), no catabolismo de contaminantes, como pesticidas e metais pesados (STURTZ et al., 2000), e na defesa contra patógenos invasores (STURTZ et al., 1999, DOWNING; THOMSON, 2000; STURTZ; NOWAK, 2000).

O uso de bactérias endofíticas pode ser considerado uma nova estratégia para o biocontrole de patógenos. Essas rizobactérias possuem a vantagem de não terem competidores como ocorre na rizosfera, além de terem mais nutrientes disponíveis, menos exposição a estresses ambientais e melhor possibilidade de translocação de metabólitos na planta hospedeira (KLOEPPER, 1995; CHANWAY, 1996).

## **2.7. Produção de fitormônios**

As rizobactérias fitoestimuladoras do crescimento de plantas atuam de forma direta, por meio da produção de fitormônios, como auxinas, citocininas, giberilinas e etileno (DOBBELAERE et al., 2003).

O fitormônio mais ativo em plantas é o ácido-3-indol-acético (AIA). Estima-se que aproximadamente 80% das rizobactérias podem produzir esse regulador de crescimento (PATTEN; GLICK, 1996). Em bactérias como *Azospirillum* spp., a produção de auxina, que é quantitativamente abundante, é o fator responsável pelo desenvolvimento das raízes e, conseqüentemente, pelo maior crescimento da planta (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

As citocininas e as giberelinas também desempenham papéis importantes no crescimento de plantas. As citocininas estão envolvidas na divisão celular e no crescimento de raiz. Pelo menos 90% dos microrganismos na rizosfera liberam citocinina. Dentre as giberelinas, o mais reconhecido é o ácido giberélico GA<sub>3</sub>, que é responsável pelo alongamento do caule (DAVIES, 1995). A produção do GA<sub>3</sub> tem sido demonstrada em *Bacillus pumillus* (GUTIERREZ-MANERO et al., 2001).

Segundo Buchenauer (1998), outro mecanismo essencial por meio do qual as PGPRs podem estimular o crescimento das plantas é a diminuição dos níveis de etileno. O etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) é um fitormônio também envolvido em vários aspectos do crescimento

de plantas, pois a sua presença pode ser benéfica ou não, dependendo da concentração e do estágio de desenvolvimento da planta. Se o nível de etileno permanecer alto após a germinação, o alongamento de raízes será inibido (JACKSON, 1991). Portanto, tem sido proposto o estudo do efeito de rizobactérias sobre o crescimento por meio da redução dos níveis de etileno nas plantas ( DOBBELAERE et al., 2003).

A auxina mais comumente produzida na natureza é a 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 das bactérias presentes no solo é capaz 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) sugeriu o envolvimento de AIA na regulação da produção de outros compostos importantes no desenvolvimento bacteriano, promotores de crescimento em plantas.

## **2.8. Controle biológico**

As perdas de produtividade devido à ocorrência de fitopatógenos são estimadas entre 25 e 100%, dependendo da cultura e da doença em questão (OLIVEIRA et al., 2003). Além disso, na maioria das ocorrências fitopatogênicas, a ausência de sintomas visíveis pode se prolongar muito, e apenas ligeiras alterações ambientais podem ocasionar a disseminação generalizada de uma certa doença (GLICK; BASHAN, 1997). Várias substâncias produzidas por rizobactérias possuem efeito de controle sobre os danos causados por fitopatógenos, como sideróforos, enzimas, antibióticos e outras moléculas

### **2.8.1. Produção de antibióticos, hidrocianetos, enzimas e substâncias voláteis**

Alguns isolados de rizobactérias, principalmente dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, são capazes de produzir antibióticos e outros compostos de baixo peso molecular, efetivos na supressão de doenças radiculares (ELLIS et al., 1979). Além dos antibióticos, determinadas rizobactérias produzem metabólitos específicos ou não-específicos, agentes líticos, enzimas, compostos voláteis e outras toxinas microbianas (LAMBERT et al., 1987; LEYNS et al., 1990).

A eficiência no controle de patógenos por antibióticos depende da sensibilidade da população do patógeno-alvo. A introdução de diferentes isolados de rizobactérias que produzem antibióticos, mas que diferem no modo de ação, pode resultar em controle mais efetivo e minimizar a inconsistência do controle (BUCHENAUER, 1998).

Alguns patógenos colonizadores de raiz podem ser afetados por hidrocianetos e outros compostos voláteis produzidos por rizobactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Além disso, algumas rizobactérias são capazes de produzir enzimas líticas com propriedades antifúngicas, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos de algumas espécies de fungos. Em tabaco, os hidrocianetos estimulam o crescimento de pêlos radiculares, conferindo aumento da resistência a doenças (BUCHENAUER, 1998).

### **2.8.2. Produção de sideróforos**

A produção de sideróforos está entre os mecanismos nos quais os microrganismos da rizosfera inibem os patógenos de plantas. Essa inibição ocorre porque muitos organismos necessitam do ferro a uma concentração não-disponível. Assim, as rizobactérias desenvolveram sistemas altamente eficientes de resgate de ferro, através da produção e secreção de sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular que formam quelatos de ferro. Os quelatos de ferro são produzidos sob condições de biodisponibilidade limitada, sendo as moléculas de ferro complexadas atraídas por membranas protéicas receptoras específicas e transportadas para dentro das células. Os sideróforos produzidos por *Pseudomonas* são altamente específicos e não são utilizados por outros microrganismos (BUCHENAUER, 1998).

### **2.8.3. Indução de resistência sistêmica**

As rizobactérias benéficas são capazes de controlar doenças radiculares por meio de mecanismos antagônicos e pela indução de resistência sistêmica (ISR), podendo os sideróforos estar envolvidos nesse mecanismo (BUCHENAUER, 1998).

Vários isolados de *Pseudomonas* têm a habilidade de induzir a um estado de resistência sistêmica nas plantas, promovendo a proteção contra um amplo espectro de fitopatógenos, como fungos, bactérias e vírus (Van LOON et al., 1998).

Observaram-se evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) em mudas de *Eucalyptus* spp., quando inoculadas com rizobactérias

promotoras de crescimento, resultando na diminuição de aplicação de fungicidas e otimizando a produção de mudas clonais.

#### **2.8.4. Competição por espaço e nutrientes**

A competição por espaço e nutrientes é um mecanismo importante no controle de doenças de plantas (BUCHENAUER, 1998). Algumas rizobactérias, com alta afinidade por ferro, são capazes de inibir fitopatógenos em solos com limitação desse nutriente (SCHROTH; HANCOCK, 1982; DOWLING et al., 1996). De forma análoga, as rizobactérias podem reduzir a quantidade de carbono e nitrogênio disponíveis para a germinação dos esporos fúngicos e para os processos de pré-infecção radicular (FILONOW; LOCKWOOD, 1983; ELAD; BAKER, 1985).

#### **2.8.5. Especificidade bactéria/planta**

A interação entre isolados de rizobactérias e genótipos da planta de interesse foi muito estudada, porém não existe consenso sobre o assunto (KLOEPPER, 1996; MAFIA 2004).

Quando isolados selecionados por induzir à resistência sistêmica na cultura do pepino e tomate foram empregados para inoculação de espécies de *Pinus*, observou-se efeito significativo na velocidade de germinação das sementes, na biomassa da parte aérea e no número de ramos por planta de *P. taeda* L., como também no peso e na altura da parte aérea de *Pinus elliottii* Engelm, dependendo do isolado empregado (LIU et al., 1995; WEI et al., 1996).

Alguns estudos mostram que existe uma importante especificidade de resposta para espécies arbóreas tratadas com rizobactérias promotoras do crescimento, o que, aparentemente, depende das condições ambientais e geográficas do local de estudo (O'NEILL et al., 1992; CHANWAY; HOLL, 1993). Assim, isolados promotores de crescimento para uma espécie de planta podem não ser efetivos em outras (SCHROTH; HANCOCK, 1982). Diferenças na quantidade e qualidade de exsudatos radiculares de diversas espécies de plantas, bem como de cultivares e genótipos de uma mesma espécie, têm sido relatadas como a causa dessas variações (BALDANI; DOBEREINER, 1980; SHISHIDO; CHANWAY, 1999).

O estudo do nível, da variação e da maneira como a especificidade afeta as populações de bactérias é de grande importância, porém é ainda muito pouco

explorado. A variação quanto à supressão de doenças, produção de antibióticos e colonização para várias interações tem sido descrita, porém as bases genética e mecânica dessa variação ainda precisam de estudos mais aprofundados (SMITH; GOODMAN, 1999).

### 3. OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se neste trabalho: i- isolar e selecionar rizobactérias promotoras do crescimento de *P. taeda* L.; ii – determinar o grau de especificidade dos isolados de rizobactérias para diferentes espécies de pinus; iii – avaliar o efeito de isolados promotores de crescimento sobre o padrão de qualidade de mudas de *Pinus* sp.; iv – avaliar a capacidade de colonização das rizobactérias em raízes de mudas de *Pinus* sp.; e v – avaliar a solubilização de fosfatos inorgânicos pelas rizobactérias isoladas de *P. taeda* L.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSTRÖM, S. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. **Vaxtskyddsnotiser**, v. 58, p. 37-41, 1994.

AMARAL, M. A. T./ DAHDOH, M. S. A. Effect of inoculation with plant - growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield e uptake of nutrients by wheat grown on sandy soils. **Egyptian Journal of Soil Science**, v. 37, p. 467-484, 1997.

AZCÓN-AQUILAR, C.; BAREA, J. M. Interactions between mycorrhizal fungi e other rhizosphere microorganisms. In: ALLEN, M. J. (Ed.). **Mycorrhizal functioning: an integrative plant fungal process**. London: Chapman e Hall., 1992. p. 163-198.

BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v. 112, p. 919-929, 1996.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion e biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 4, p. 343-350, 2001.

BOLTON, H. J.; FREDERICKSON, J. K.; ELLIOTT, L. F. Microbial ecology of the rhizosphere. In: METTING, F. B. J. (Ed.). **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 27-63,

BOWEN, G. D.; ROVIR A, A. D. The rhizosphere e its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, p. 1-102, 1999.

- BRITO ALVAREZ, M. A., GAGNE, S.; ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato e on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 61, p. 194-199, 1995.
- BROWN, M. E. Seed e root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 181-197, 1974
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases e Protection**, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.
- BURR, T. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, p. 1-20, 1984.
- CHANWAY, C. P.; HOLL, F.B. Ecotypic specificity of spruce emergence-stimulating *Pseudomonas putida*. **Forest Science**, v. 39, p. 520-527, 1993.
- CHANWAY, C. P. Bacterial endophytes: ecological e practical implications. **Sydowia**, v. 50, p. 149-170, 1998.
- CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.
- CHANWAY, C. P.; HOLL, F. B. Biomass increase e associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 507-511, 1991.
- CHANWAY, C. P.; NELSON, L. M. Tissue culture bioassay for plant growth promoting rhizobacteria. **Soil Biology Biochemystry**, v. 23, p. 331-333, 1991.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; W.; PRIESTER, van der BIJ, A. J.; LUGTENBERG, B. J. J. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens biocontrol strain WCS365 using scanning electron microscopy*. **Mol Plant-Microbe Interact**, v. 10, p. 79-86, 1997.
- CURL, E. A.; TRUELOVE, B. Root exudation. In: **The rhizosphere**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p. 52-54.
- DARBYSHIRE, J. F.; GREAVES, M. P. Bacteria e protozoa in the rhizosphere. **Pesticide Science**, v. 4, p. 349-360, 1973.
- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, e functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry, e molecular biology**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 1995. p. 13-18.
- DE LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. Functional diversity of the rhizosphere. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. (Eds.). **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status e future prospects. Proceedings... 4<sup>th</sup> Intern. Workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, Japan-OECD joint workshop**. Sapporo:, 1997. p. 38-43.

- DE WEGER, L. A.; van der BIJ, DEKKERS, A. J.; L. C.; SIMONS, M.; WIJFFELMAN, C. A.; LUGTENBERG, B. J. J. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 221-228, 1995.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.
- DOWLING, D. N.; SEXTON, R.; FENTON, A.; DELANY, I.; FEDI, S.; MCHUGH, B.; CALLANAN, M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; O'GARA, F. Iron regulation in plant-associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control. In: NAKAZAWA, K.; FURUKAWA, K.; HAAS, D.; SILVER, S. (Eds.). **Molecular biology of pseudomonads**. Washington, DC: ASM Press, 1996. p. 502-511.
- DOWNING, K. J.; THOMSON, J. A. Introduction of the *Serratia marcescens chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 363-369, 2000.
- ELAD, Y., BAKER, R. Possible role of competition for iron e carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 75, p. 1053-1059, 1985.
- ELLIS, J. G.; KEER, A.; van MONTAGU, M.; SCHELL, J.; HERNALSTEENS, J. P.; SHILPEROORT, R.A. Agrobacterium: genetic studies on agromycin 84 production e the biological control of crown gall. **Physiology Plant Pathology**, v. 15, p. 311-319, 1979.
- FILONOW, A. B.; LOCKWOOD, J. L. Mycostasis in relation to the microbial nutrient sinks of five soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, p. 557-565, 1983.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Available in: <[www.fao.org](http://www.fao.org)>. Accessed in: 18 jul. 2006.
- FREITAS, J. R. D.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J.; DE FREITAS, J. R. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth e yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology e Fertility of Soils**, v. 24, p. 358-364, 1997.
- GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 128, p. 197-209, 1994.
- GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical e genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. London: Imperial College Press, 1999. 270 p.
- GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 353-378, 1997.

- GRAYSTONE, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology Biochemistry**, v. 30, p. 369-378, 1998.
- GUTIERREZ MANERO, F. J.; ACERO, N.; LUCAS, J. A.; PROBENZA, A. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterisation e biological assays of metabolites from growth promoting e growth inhibiting bacteria. **Plant e Soil**, v. 182, p. 67-74, 1996.
- GUTIERREZ-MANERO, F. J.; RAMOS, S. B.; PROBENZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; TALON, M.. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiology Plant**, v. 111, p. 206-211, 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HILTNER, L. Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft**, v. 98, p. 59-78, 1904.
- HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P. Rhizosphere colonisation e seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 303-308, 1992.
- HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. Response of crested wheatgrass *Agropyron tatum* L. perennial ryegrass *Lolium perenne* e white clover *Trifolium repens* L. to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 19-24. 1988.
- HOWEL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Supression of Phytium ultimum-induced damping off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* e its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology**, v. 70, p. 712-715, 1980.
- JACKSON, M. B. Ethylene in root growth e development. In: MATOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Eds.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 1991. p. 159-181.
- KATSY, E. I. Participation of auxins on regulation of bacterial and plant gene expression [Russian]. **Genetika.**, v. 33, p. 565-576, 1997.
- KIM, D. S.; COOK, R. J.; WELLER, D. M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Phytopathology**, v. 87, p. 551-558, 1997.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants e effect on growth response. **Plant and Soil**, v. 144, p. 267-272, 1992.
- KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe- microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996.

- KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 137-166.
- KLOEPPER, J. W., TUZUN, S., KUC, J. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science e Technology**, v. 2, p. 347-349, 1992.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radish. In: INTERNATIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 3., Tours: Gilbert-Clarey, 1978. v. 2. p. 879-882.
- KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWICZ, R. M.; TIPPING, E. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. (Eds.). **The rhizosphere e plant growth. Beltsville Symposia in Agricultural Research**, n. 14. p. 315-326, 1991.
- KODA, Y. The role of jasmonic acid e related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, v. 135, p. 155-199, 1992.
- KUMAR, B. S. D. Disease suppression e crop improvement through fluorescent pseudomonads isolated from cultivated soils. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 14, p. 735-741, 1998.
- LAMBERT, B.; LEYNS, F.; van ROOYEN, L.; GOSELÉ, F.; PAPON, Y.; SWINGS, J. Rhizobacteria of maize e their fungal activities. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 53, p. 1866-1871, 1987.
- LEYNS, F., LAMBERT, B., JOOS, H., SWINGS, J. Antifungal bacteria from different crops. In: HORNBY, D. (Ed.). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingford: CAB International, 1990. p. 437-444.
- LINDERMAN, R. G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae e soil microbial interactions. In: BETHLEN-FALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Eds.). **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: 1992. p. 45-70. (ASA Special Publication, 54)
- LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, v. 85, p. 1064-1068, 1995.
- LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L. C. What makes *Pseudomonas* rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**, v. 1, p. 9-14, 1999.
- LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere e plant growth**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 129, n. 1, p. 1-10, 1991.
- MAFIA, R. G. **Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto**. 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press. 1995. 889 p.
- McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn e cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 895-901, 1995.
- MERHARG, A. A.; KILLHAM, K. Loss of exudates from roots of perennial rye-grass inoculated with a range of microorganisms. **Plant Soil**, v. 170, p. 345-349, 1995.
- MEYER, J. R.; LINDERMAN, R. G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi e a plant growth promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 18, p. 185-190, 1986.
- MICHIELS, K. W.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasiliense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2241-2246, 1991.
- MINERDI, D.; BIANCIOTTO, V; BONFANTE, P. Endosymbiotic bacteria in mycorrhizal fungi: from their morphology to genomic sequences. **Plant e Soil**, v. 244, p. 211-219. 2002.
- MISHUSTIN, E. N.; NAUMOVA, A. N. Bacterial fertilizers, their effectiveness e mechanisms of action. **Mikrobiologija**, v. 31, p. 543-545, 1963.
- MITCHELL, J. E. The effects of roots on the activity of soil-borne plant pathogens. **Physiology Plant Pathology**, v. 4, p. 104-128, 1976.
- NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-10, 1996.
- OLD, K. M.; NICOLSON, T. H. The root cortex as part of a microbial continuum. In: LOUTIT, M. V., MILES, J. A. R. (Eds.). **Microbial ecology**. Berlin: Springer, 1978. p. 291-294.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia - Documentos, 161).
- O'NEILL, G. A.; CHANWAY, C. P.; AXELROOD, P. E.; RADLEY, R. A.; HOLL, F. B. An assessment of spruce growth response specificity after inoculation with coexistent rhizosphere bacteria. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 2347-2353, 1992.
- PARKE, J. L; MOEN, R.; ROVIRA, A. D.; BOWEN, G. D. Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 18, p. 583-588, 1986.
- PARMAR, N.; DARDARWAL, K. R. Stimulation of nitrogen fixation e induction of flavonoid like compounds by rhizobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 36-44, 1999.

- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Botany**, v. 42, p. 207-220, 1996.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell e Environment**, v. 26, p. 189-199, 2003.
- PETERSEN, C. A.; EMANUEL, M. E.; HUMPHREYS, G. B. Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) e broad bean (*Vicia faba*). **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 618-625, 1981.
- PROBANZA, A.; MATEOS, J. L.; LUCAS, J. A.; RAMOS, B.; FELIPE, M. R. Effects of Inoculation with PGPR *Bacillus* e *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth Bacterial Rhizosphere Colonization, e Mycorrhizal Infection. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 140-148, 2001.
- QUADT-HALLMAN, A.; BENHAMOU, N.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal Microbiology**, v. 43, p. 577-582, 1997.
- RAINEY, P. B. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 243-257, 1999.
- ROVIRA, A. D.; DAVEY, C. B. Biology of the rhizosphere. In: CARSON, E. W. (Ed.). **The plant root e its environment**. Charlottesville: Univerity Press of Virginia, 1974. p. 154-204.
- SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil e root colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p. 1376-1381, 1982.
- SCHROTH, M. N.; HILDEBRANDT, D. C. Influence of plant exudates on root-infection fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 101-132, 1964.
- SEVILLA, M.; BURRIS, R. H., GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth e 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type e *Nif*-mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 358-366, 2001.
- SHIPPERS, B.; BAKKER, A. M.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions of deleterious e beneficial rhizosphere microorganisms e the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 339-358, 1987.
- 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.
- SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 473-491, 1999.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Endophytic bacterial systems governing red clover growth e development. **Annals of Applied Biology**, v. 126, p. 285-290, 1995.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers e their potential to improve resistance to soil-borne pathogens. **Plant Pathology**, v. 48, p. 360-369, 1999.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Review on Plant Science**, v. 19, p. 1-30, 2000.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria e the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 183-190, 2000.

TEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical e ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, p. 487-506, 2000.

TOMBOLINI, R.; van der GAAG, D. J.; GERHARDSON, B.; JANSSON, J. K. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3674-3680, 1999.

Van LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Signalling in rhizobacteria-plant interactions. **Ecological studies**, v. 168, p. 297-330, 2003.

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.

VANCURA, V. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants e their relation to roor exudates. **Folia Microbiol**, v. 25, p. 168-173, 1980.

VARANIMI, Z.; NANNIPIERI, P. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The Rhizosphere: biochemistry e organic substances at the soil-plant interface**. New York: Marcel Dekker, 2003. 424 p.

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

WELLER, D. M. Application of fluorescent pseudomonades to control root diseases. In: PARKER, C. A.; ROVIRA, A. D.; MOORE, K. J.; WONG, P. T. W. (Eds.). **Ecology e management of soilborne plant pathogens**. Proceedings of section 5 of the fourth international congress of plant pathology. St. Paul.: The American Phytopathological Society, 1985. p. 137-140.

WELLER, D. M.; COOK, R. J. Suppression of take-all of wheat by seeds treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v. 73, p. 463-509, 1983.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O'GARA, F.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. (Eds.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms biotechnology e the release of GMOs**. Weinheim: V CH, 1994. p. 1-18.

WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v. 26, p. 1-133, 1997.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions e biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

## ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE *Pinus taeda*

RESUMO – No presente trabalho objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias promotoras do crescimento de *P. taeda*. O isolamento foi realizado a partir de mudas com 150 dias de idade e a seleção foi feita por meio da inoculação dos isolados ( $10^8$  u.f.c/mL), na proporção de 0,1 mL de inóculo/cm<sup>3</sup> de substrato. Aos 150 dias de semeadura, avaliaram-se as seguintes variáveis: a altura da parte aérea, o diâmetro do coleto e os pesos de matéria seca de raízes e da parte aérea. Dentre 99 isolados testados em *P. taeda*, apenas seis (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 e UFV-G4) destacaram-se quanto à indução de crescimento e ao melhor índice de qualidade de muda. Não se observaram diferenças significativas entre a testemunha e os demais isolados testados.

Palavras-chave: *Pinus*, rizobactérias, qualidade de mudas e viveiro.

## ISOLATION AND SELECTION OF *Pinus taeda* GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA

ABSTRACT – The objectives of this research were to isolate and select *P. taeda* growth promoting rhizobacteria. The bacteria were isolated from 150 day-old pine seedlings and the selection was carried with the strains inoculation ( $10^8$  u.f.c/mL) in the proportion of 0,1 mL/cm<sup>3</sup>. After 150 days of sowing, aerial part height, stem diameter and roots and aerial part dry matter weight were evaluated. From the 99 tested strains, six (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 and UFV-G4) stood out due to their capacity of stimulating the growth and quality improvement of *P. taeda* seedling. Significantly differences were not observed between the control and the other tested strains.

Keywords: *Pinus*, rhizobacterias, seedling quality and nursery.

### 1. INTRODUÇÃO

Os plantios florestais com espécies de rápido crescimento ocupam, no Brasil, aproximadamente 4,8 milhões de hectares, dos quais cerca de 2,2 milhões de hectares correspondem a espécies de *Pinus* (FAO, 2006). A madeira oriunda desses plantios tem

sido utilizada para produção de carvão, celulose, compensados, aglomerados, chapas de fibras, painéis, entre outros. Diante da crescente demanda de madeira e da importância econômica do setor, torna-se necessário otimizar as diferentes fases da cadeia produtiva de *Pinus*, incluindo a produção de mudas. Neste sentido, é fundamental desenvolver formas alternativas, visando reduzir o tempo de produção e melhorar a qualidade das mudas. As mudas devem apresentar características que possam oferecer certa resistência às condições climáticas adversas que poderão ocorrer pós-plantio, mesmo que este tenha sido efetuado em condições favoráveis de umidade de solo (CARNEIRO, 1995).

Estudos recentes comprovaram o efeito benéfico da aplicação de rizobactérias em substrato de produção de mudas sobre o enraizamento, o crescimento e o biocontrole de doenças do eucalipto (TEIXEIRA, 2001; MAFIA, 2004/ TEIXEIRA et al., 2005). A região do solo, ou substrato, sob influência do sistema radicular das plantas, definida como rizosfera, é intensamente colonizada por vários microrganismos, sendo as bactérias que colonizam essa região denominadas de rizobactérias (SCHROTH; HANCOCK, 1982). As rizobactérias interagem com as raízes (KUNC; MACURA, 1988), o que pode resultar em efeito benéfico, prejudicial ou neutro à planta. Bactérias que beneficiam são denominadas “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas”, pois são capazes de colonizar as raízes e estimular o crescimento, quando aplicadas na rizosfera, nos tubérculos ou em sementes (KLOEPPER et al., 1989).

Em experimentos com várias espécies de *Pinus*, constataram-se aumento no crescimento e desenvolvimento de mudas (CHANWAY et al., 2000), colonização do sistema radicular (BENT et al., 2002), indução de resistência sistêmica a doença (ENEBAK; CAREY, 2004) e alteração dos níveis hormonais e na respiração de raízes inoculadas com rizobactérias (BENT et al., 2001).

No presente trabalho objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias com potencial para utilização na produção de mudas de *P. taeda* L., visando aumentar o crescimento e a qualidade de mudas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Isolamento de rizobactérias**

Foram realizados isolamentos de rizobactérias da rizosfera e de segmentos radiculares de mudas de *P. taeda*, cultivadas em tubetes cônicos de 50 mL, com 150 dias de idade, oriundos de Telêmaco Borba (PR) e de Mogi-Guaçu (SP). Para isso,

cerca de 1 g de substrato rizosférico e de segmentos radiculares foi colocado em erlenmeyers, contendo 20 mL de água destilada esterilizada. Após agitação por 40 segundos, em “*minishaker*” a 1.000 rpm, a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada.

Realizou-se então, em tubos de ensaio, a diluição seriada na razão de 1:10 do filtrado até a diluição  $1 \times 10^{-5}$ , procedendo-se à transferência de 1 mL das três últimas diluições em meio B de King (KING et al., 1954). Na seqüência, os mesmos tubos de ensaio contendo as três últimas diluições foram aquecidos a 80 °C e mantidos a essa temperatura, em banho-maria, por 20 minutos, antes da transferência de 1 mL para meio de Kado e Heskett (1970), para isolamento seletivo de *Bacillus* spp.

Para purificar as colônias com diferentes características morfológicas, após incubação por 24 h, a 28 °C, no escuro, essas foram repicadas por três vezes e, então, transferidas individualmente para tubos de ensaio, contendo meio de Kado e Heskett inclinado, e armazenadas a 5 °C.

## **2.2. Seleção dos isolados de rizobactérias**

Para seleção dos isolados foram conduzidos quatro ensaios independentes no viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, Viçosa-MG, sendo um instalado em abril, outro em agosto e dois em setembro de 2004.

As sementes de *P. taeda* (procedentes da APS – Telêmaco Borba/Klabin Florestal S.A.) empregadas no ensaio foram previamente submetidas à quebra de dormência, por meio da estratificação em areia umedecida a 10 °C, por 26 dias.

Para produção de inóculo, cada isolado de rizobactéria foi cultivado, separadamente, em placa de Petri com meio recomendado por Kado e Heskett (1970). Após incubação por 24 h, a 28 °C, no escuro, procedeu-se à raspagem do crescimento das rizobactérias, utilizando-se solução salina (NaCl, 0,85%). A densidade ótica de cada suspensão foi ajustada para 0,2 de absorbância em 540 nm, o que corresponde, aproximadamente, a  $10^8$  u.f.c./mL, conforme correlação entre densidade ótica e número de unidades formadoras de colônias (ufc), com base em Teixeira (2001).

O inóculo foi aplicado ao substrato de produção de mudas (Plantmax<sup>®</sup>), na proporção de 0,1 mL/cm<sup>3</sup> de substrato antes da semeadura, em tubetes de 50 cm<sup>3</sup>. Os substrato umedecido com solução salina, autoclavada na mesma proporção, serviu como testemunha. Além da inoculação com os isolados de rizobactérias, realizou-se a

aplicação de acículas picadas de *Pinus*, como fonte inicial de fungos micorrízicos, antes do plantio, na proporção de 1:6 (p/p).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, composto de cinco repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída de 20 mudas. Os tratamentos constaram da inoculação de mudas de *P. taeda* cultivadas em tubetes com 50 cm<sup>3</sup> de substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, com cada um dos isolados de rizobactéria, separadamente. Foi mantido um controle sem inoculação.

A semeadura foi realizada diretamente nos tubetes, e aos 20 dias realizou-se o raleio, deixando-se apenas uma muda vigorosa no centro de cada tubete. Os tubetes foram mantidos inicialmente em casa de sombreamento (50% de luminosidade natural), acondicionados em bandejas planas com capacidade para 1.200 tubetes, suspensas a 80 cm do solo. Imediatamente após ao raleio das plântulas, estas foram transferidas para casa de vegetação, coberta com lona plástica transparente e com abertura lateral.

A ocupação das bandejas nos primeiros 30 dias foi de 100%, deixando apenas uma linha vazia entre cada repetição; após esse período as mudas foram espaçadas, para capacidade de 50%.

A irrigação das mudas e os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendações específicas para produção de mudas de pinus.

A adubação de base do substrato foi feita com 10 kg de NPK (20-0-20) e 4 kg de Fosmag 400<sup>®</sup> (fosfato magnésiano) por m<sup>3</sup> de substrato. A adubação de formação iniciou-se aos dez dias após a operação de raleio, em intervalos de 15 dias, com aplicação de 5 mL de solução, contendo 25 kg de superfosfato simples, 11 kg de sulfato de amônia e 5 kg de cloreto de potássio em 1.000 L de água.

### **2.3. Avaliações, delineamento experimental e análises estatísticas**

Aos 150 dias após semeadura, avaliaram-se a altura da parte aérea e o diâmetro do coleto, bem como o peso de matéria seca de raízes e da parte aérea. A determinação da matéria seca foi realizada após separação da parte aérea do sistema radicular e secagem em estufa a 70 °C, por 24 h. Os dados da altura da parte aérea (APA), do diâmetro do coleto (DC) e do peso de matéria seca de raízes (PMSR) e da parte aérea (PMSPA) foram empregados para cálculo do índice de qualidade de Dickson (IQD), definido por Dickson et al. (1960).

$$IQD = (PMSPA+PMSR) / ((APA/DC)+(PMSPA/PMSR))$$

em que

*APA* = altura da parte aérea da muda, do colo até a ponta do broto mais alto (cm);

*DC* = diâmetro do coleto (na altura do colo da planta) (mm);

*PMSR* = peso de matéria seca de raízes (g); e

*PMSPA* = peso de matéria seca da parte aérea (g)

Os experimentos de seleção de isolados foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, compostos de cinco repetições por tratamento, cada uma constituída de 20 unidades amostrais. Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F, a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot (a 5% de probabilidade), com o auxílio do programa SAEG (EUCLYDES, 1983).

Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F, a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot (a 5% de probabilidade), com o auxílio do programa SAEG (EUCLYDES, 1983).

### 3. RESULTADOS

Na primeira etapa do trabalho, obtiveram-se 196 isolados de rizobactérias, com uma média de cinco isolados por planta, oriundas de 20 amostras de raízes. Os isolados apresentaram grande variação quanto à morfologia da colônia, incluindo consistência, elevação, cor, velocidade e forma de crescimento. Estes isolados se encontram devidamente identificados e armazenados a 5 °C, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

A seleção dos melhores isolados foi baseada na altura da parte aérea das mudas, juntamente com o índice de qualidade de Dickson.

Em quatro seleções, utilizando-se 99 das rizobactérias isoladas, constatou-se que houve efeito benéfico da inoculação sobre o crescimento das mudas, julgando-se pelos incrementos observados na altura da parte aérea e no peso de matéria seca de raízes e da parte aérea, bem como sobre a qualidade, definida pelo índice de qualidade de Dickson.

Na primeira seleção, não houve diferença significativa da altura da parte aérea e do diâmetro de coleto em função da inoculação das rizobactérias. No entanto, quatro (UFV-E2, UFV-F4, UFV-C4 e UFV-B3) dos 26 isolados utilizados neste mesmo ensaio induziram ao incremento do peso de matéria seca da parte aérea e oito (UFV-F4,

UFV-B3, UFV-D6, UFV-E2, UFV-F9, UFV-A3, UFV-E6 e UFV-C4) promoveram aumento do peso de matéria seca do sistema radicular de *P. taeda* (Quadro 1).

**Quadro 1** – Média da altura da parte aérea (APA), diâmetro do coleto (DC), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e de raízes (PMSR) e índice de qualidade de Dickson (IQD) do primeiro ensaio de seleção de mudas de *P. taeda* aos 150 dias de semeadura

**Table 1** – *Aerial part height, stem diameter, aerial part and root dry matter weight and Dickson quality index averages of P. taeda seedlings first selection essay, 150 days after sowing*

Isolado	APA (cm)	DC (mm)	PMSPA (g)	PMSR (g)	IQD
UFV-D9	13,5 a	2,32 a	0,54 b	0,33 b	0,1180 b
UFV-D4	14,0 a	2,43 a	0,59 b	0,37 b	0,1314 b
UFV-B5	13,5 a	2,47 a	0,57 b	0,35 b	0,1329 b
<b>UFV-D6</b>	13,5 a	2,51 a	0,54 b	<b>0,43 a</b>	<b>0,1478 a</b>
UFV-F10	13,5 a	2,40 a	0,56 b	0,37 b	0,1318 b
UFV-F2	13,5 a	2,33 a	0,57 b	0,36 b	0,1298 b
UFV-D3	13,5 a	2,34 a	0,54 b	0,36 b	0,1256 b
<b>UFV-F9</b>	13,0 a	2,43 a	0,52 b	<b>0,42 a</b>	<b>0,1426 a</b>
<b>UFV-A3</b>	13,0 a	2,43 a	0,58 b	<b>0,42 a</b>	<b>0,1486a</b>
<b>UFV-C4</b>	14,0 a	2,46 a	<b>0,64 a</b>	<b>0,39 a</b>	<b>0,1443 a</b>
UFV-G5	13,0 a	2,26 a	0,51 b	0,36 b	0,1228 b
<b>UFV-F4</b>	13,5 a	2,50 a	<b>0,64 a</b>	<b>0,48 a</b>	<b>0,1664 a</b>
<b>UFV-E2</b>	14,5 a	2,56 a	<b>0,70 a</b>	<b>0,43 a</b>	<b>0,1581a</b>
UFV-D1	13,5 a	2,39 a	0,55 b	0,35 b	0,1260 b
UFV-D11	13,0 a	2,41 a	0,53 b	0,38 b	0,1355 b
UFV-E3	12,5 a	2,30 a	0,50 b	0,34 b	0,1204 b
UFV-G9	13,0 a	2,41 a	0,56 b	0,36 b	0,1308 b
UFV-F7	13,0 a	2,43 a	0,57 b	0,37 b	0,1356 b
UFV-B4	13,0 a	2,21 a	0,52 b	0,33 b	0,1181 b
UFV-B2	13,0 a	2,39 a	0,54 b	0,35 b	0,1284 b
<b>UFV-E6</b>	13,0 a	2,35 a	0,50 b	<b>0,41 a</b>	0,1378 b
<b>UFV-B3</b>	13,5 a	2,96 a	0,60 a	<b>0,46 a</b>	<b>0,1861 a</b>
UFV-D12	13,0 a	2,17 a	0,46 b	0,31 b	0,1055 b
UFV-E1	12,5 a	2,26 a	0,46 b	0,33 b	0,1164 b
UFV-B7	13,5 a	2,27 a	0,56 b	0,34 b	0,1184 b
TEST	13,5 a	2,37 a	0,55 b	0,36 b	0,1275 b
<b>CV (%)</b>	<b>6,148</b>	<b>10,795</b>	<b>16,284</b>	<b>15,947</b>	<b>19,178</b>

Médias seguidas da mesma letra, para cada variável, não diferem estaticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

No segundo ensaio, dos 15 isolados de rizobactérias testados, seis (UFV-A4, UFV-F3, UFV-F6, UFV-I1, UFV-G2, UFV-G4 e UFV-R6) demonstraram diferenças significativas de diâmetro do coleto em relação às mudas-testemunha (UFV-G2, UFV-F3, UFV-G4 e UFV-F6), e quatro estimularam significativamente o crescimento em altura da parte aérea das mudas. Todavia, não se observou aumento do peso de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea das mudas. Dentre esses, três

(UFV-G2, UFV-F3 e UFV-G4) apresentaram diferenças significativas para o índice de qualidade de Dickson, porém com valores superiores ao de 0,50 atingido pelas mudas-testemunha (Quadro 2).

**Quadro 2** – Média da altura da parte aérea (APA), diâmetro do coleto (DC), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e de raízes (PMSR) e índice de qualidade de Dickson (IQD) do segundo ensaio de seleção de mudas de *P. taeda* aos 150 dias de semeadura

**Table 2** – Aerial part height, stem diameter aerial part and root dry matter weight and Dickson quality index averages of *P. taeda* seedlings second selection essay, 150 days after sowing

Isolado	APA (cm)	DC (mm)	PMSPA (g)	PMSR (g)	IQD
UFV-A4	20,0 b	<b>2,89 b</b>	0,96 a	0,38 a	0,5082 a
UFV-AF5	19,0 b	2,60 c	1,12 a	0,46 a	0,5550 a
UFV-AL5	18,5 b	2,64 c	1,06 a	0,45 a	0,6163 a
UFV-AM1	19,0 b	2,71 c	1,14 a	0,47 a	0,5725 a
<b>UFV-F3</b>	<b>21,0 a</b>	<b>3.05 a</b>	1,16 a	0,46 a	0,6161 a
<b>UFV-F6</b>	<b>20,5 a</b>	<b>2.95 b</b>	1,10 a	0,38 a	0,4936 a
<b>UFV-G2</b>	<b>21,5 a</b>	<b>3.17 a</b>	1,26 a	0,43 a	0,5513 a
<b>UFV-G4</b>	<b>20,5 a</b>	<b>2.99 b</b>	1,10 a	0,39 a	0,5132 a
UFV-H2	19,0 b	2,65 c	1,14 a	0,49 a	0,6676 a
UFV-K3	19,0 b	2,73 c	1,18 a	0,45 a	0,6019 a
UFV-N3	17,5 b	2,50 c	1,05 a	0,39 a	0,5182 a
UFV-P2	18,5 b	2,65 c	1,07 a	0,47 a	0,6504 a
UFV-P5	18,5 b	2,37 c	0,91 a	0,35 a	0,4679 a
UFV-Q2	18,0 b	2,62 c	1,07 a	0,47 a	0,6071 a
UFV-R6	19,0 b	<b>2,87 b</b>	1,24 a	0,47 a	0,6250 a
TEST	18,5 b	2,75 c	0,91 a	0,37 a	0,5056 a
<b>CV (%)</b>	<b>6,577</b>	<b>8,955</b>	<b>19,616</b>	<b>21,987</b>	<b>24,414</b>

Médias seguidas da mesma letra, para cada variável, não diferem estaticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

No terceiro ensaio, dos 35 isolados testados, três (UFV-AM2, UFV-AL9 e UFV-AM5) contribuíram significativamente para o aumento do crescimento em altura da parte aérea das mudas e do índice de qualidade de Dickson, em relação às mudas-testemunha (Quadro 3). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao diâmetro do coleto e peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular das mudas de *P. taeda*.

No quarto ensaio, nenhum dos 24 isolados testados promoveu influência positiva no crescimento em altura da parte aérea das mudas. No entanto, nas mudas desenvolvidas em substrato contendo 15 isolados (UFV-AC1, UFV-AE2, UFV-Y3, UFV-I1, UFV-I6, UFV-Ai4, UFV-AJ3, UFV-J8, UFV-O6, UFV-J3, UFV-X2, UFV-T3, UFV-U1, UFV-V5 e UFV-K2), foram observados o aumento do diâmetro do coleto em

relação às mudas-testemunha, em oito isolados (UFV-AC1, UFV-AE2, UFV-Y3, UFV-I1, UFV-I6, UFV-Ai4, UFV-X2 e UFV-K2); o aumento do peso seco de matéria seca da parte aérea; e em dez (UFV-AC1, UFV-AE2, UFV-I1, UFV-Ai4, UFV-AJ3, UFV-J8, UFV-U1, UFV-T3 e UFV-L3) o aumento do peso de matéria seca do sistema radicular (Quadro 4).

**Quadro 3** – Média da altura da parte aérea (APA), diâmetro do coleto (DC), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e de raízes (PMSR) e índice de qualidade de Dickson (IQD) do terceiro ensaio de seleção de mudas de *P. taeda* aos 150 dias de semeadura

**Table 3** – Aerial part height, stem diameter, aerial part and root dry matter weight and Dickson quality Index averages of *P. taeda* seedlings third selection essay, 150 days after sowing

Isolado	APA (cm)	DC (mm)	PMSPA (g)	PMSR (g)	IQD
UFV-H6	23,0 b	3,36 a	1,97 a	0,49 a	0,2364 a
UFV-I4	22,0 c	3,08 b	1,38 b	0,43 b	0,1986 b
UFV-J5	23,0 b	3,30 a	1,77 a	0,47 a	0,2623 a
UFV-K4	20,5 c	2,92 a	1,28 b	0,41 b	0,1915 b
UFV-L1	21,0 c	2,81 c	1,16 b	0,37 b	0,1665 b
UFV-M2	21,0 c	2,86 c	1,19 b	0,39 b	0,1779 b
UFV-N2	21,5 c	3,42 a	1,72 a	0,54 a	0,2491 a
UFV-O1	22,0 c	3,31 a	1,75 a	0,49 a	0,2682 a
UFV-O3	23,0 b	3,41 a	1,91 a	0,50 a	0,2663 a
UFV-P4	22,5 c	3,31 a	1,69 a	0,49 a	0,2323 a
UFV-Q1	22,0 c	3,42 a	1,74 a	0,53 a	0,2454 a
UFV-R5	23,0 b	3,41 a	1,81 a	0,50 a	0,2568 a
UFV-S3	23,0 b	3,53 a	1,76 a	0,54 a	0,2460 a
UFV-T2	22,5 c	3,22 a	1,54 a	0,46 a	0,2118 b
UFV-U2	22,5 c	3,17 b	1,55 a	0,44 b	0,2243 a
UFV-V1	21,5 c	3,20 b	1,46 b	0,47 a	0,2239 a
UFV-Y1	20,0 c	3,05 b	1,19 b	0,46 a	0,1978 b
UFV-Y5	23,0 b	3,21 b	1,55 a	0,44 b	0,2075 b
UFV-X4	21,5 c	3,27 a	1,57 a	0,49 a	0,2349 a
UFV-X6	21,5 c	3,41 a	1,70 a	0,53 a	0,2534 a
UFV-Z1	24,0 b	3,38 a	1,81 a	0,48 a	0,2531 a
UFV-AB1	21,0 c	3,13 b	1,97 a	0,46 a	0,2174 b
UFV-AC2	22,5 c	3,47 a	1,82 a	0,54 a	0,2393 a
UFV-AD2	21,0 c	3,13 b	1,44 b	0,47 a	0,2174 b
UFV-AE1	22,5 c	3,26 a	1,66 a	0,47 a	0,2348 a
UFV-AF4	22,0 c	3,06 b	1,42 b	0,43 b	0,2075 b
UFV-AG4	21,5 c	3,18 b	1,67 a	0,47 a	0,2392 a
UFV-AG8	22,0 c	3,30 a	1,66 a	0,49 a	0,2414 a
UFV-AG9	21,0 c	2,87 c	1,14 b	0,40 b	0,1730 b
UFV-AH1	22,0 c	3,33 b	1,75 a	0,50 a	0,2568 a
UFV-AI1	22,5 c	3,17 b	1,53 a	0,45 b	0,2286 a
UFV-AJ2	22,0 c	3,20 a	1,57 a	0,47 a	0,2215 b
<b>UFV-AL9</b>	<b>24,0 a</b>	3,10 b	1,48 b	0,39 b	0,2159 b
<b>UFV-AM2</b>	<b>25,0 a</b>	3,07 a	1,44 b	0,38 b	0,1912 b
<b>UFV-AM5</b>	<b>25,5 a</b>	3,36 a	1,77 a	0,44 b	0,2544 a
TEST	23,01 b	3,34 a	1,66 a	0,48 a	0,2401 a
<b>CV (%)</b>	<b>6,833</b>	<b>6,339</b>	<b>6,321</b>	<b>11,661</b>	<b>14,466</b>

Médias seguidas da mesma letra, para cada variável, não diferem estaticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

**Quadro 4** – Média da altura da parte aérea (APA), diâmetro do coleto (DC), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e de raízes (PMSR) e índice de qualidade de Dickson (IQD) do quarto ensaio de seleção de mudas de *P. taeda* aos 150 dias de semeadura

**Table 4** – Aerial part height, stem diameter, aerial part and root dry matter weight and Dickson quality index averages of *P. taeda* seedlings fourth selection essay, 150 days after sowing

Isolado	APA (cm)	DC (mm)	PMSPA (g)	PMSR (g)	IQD
<b>UFV-AA4</b>	20,0 a	2,64 b	1,22 b	<b>0,54 a</b>	0,2644 a
<b>UFV-AC1</b>	21,0 a	<b>3,00 a</b>	<b>1,47 a</b>	<b>0,58 a</b>	0,2156 a
<b>UFV-AE2</b>	21,0 a	<b>2,79 a</b>	<b>1,43 a</b>	<b>0,55 a</b>	0,1958 a
UFV-AE4	19,5 a	2,67 b	1,12 b	0,38 b	0,1478 a
UFV-AF2	19,5 a	2,64 b	1,08 b	0,50 b	0,1656 a
<b>UFV-AI4</b>	21,0 a	<b>3,03 a</b>	<b>1,40 a</b>	<b>0,62 a</b>	0,2183 a
<b>UFV-AJ3</b>	22,0 a	<b>2,86 a</b>	1,17 b	<b>0,62 a</b>	0,2075 a
<b>UFV-I1</b>	21,0 a	<b>2,86 a</b>	<b>1,42 a</b>	<b>0,62 a</b>	0,2145 a
<b>UFV-I6</b>	20,0 a	<b>2,85 a</b>	<b>1,42 a</b>	0,49 b	0,1850 a
<b>UFV-J3</b>	20,0 a	<b>3,00 a</b>	1,29 b	0,45 b	0,1723 a
<b>UFV-J8</b>	20,5 a	<b>2,78 a</b>	1,12 b	<b>0,53 a</b>	0,1898 a
<b>UFV-K2</b>	21,5 a	<b>3,01 a</b>	<b>1,34 a</b>	0,51 b	0,1964 a
UFV-L2	20,0 a	2,68 b	1,42 b	0,49 b	0,1727 a
<b>UFV-L3</b>	20,0 a	2,72 b	1,20 b	<b>0,52 a</b>	0,1785 a
<b>UFV-O6</b>	20,0 a	<b>2,98 a</b>	1,16 b	0,47 b	0,1902 a
UFV-R2	20,5 a	2,75 b	1,34 b	0,45 b	0,1628 a
UFV-S2	19,5 a	2,75 b	1,17 b	0,51 b	0,1849 a
<b>UFV-T3</b>	20,0 a	<b>2,79 a</b>	1,25 b	<b>0,53 a</b>	0,1834 a
<b>UFV-U1</b>	19,5 a	<b>2,98 a</b>	1,20 b	<b>0,53 a</b>	0,2073 a
UFV-U7	19,5 a	2,61 b	1,37 b	0,43 b	0,1559 a
<b>UFV-V5</b>	19,5 a	<b>2,80 a</b>	1,12 b	0,49 b	0,1900 a
<b>UFV-X2</b>	21,0 a	<b>2,98 a</b>	<b>1,35 a</b>	0,49 b	0,1955 a
<b>UFV-Y3</b>	20,0 a	<b>2,88 a</b>	<b>1,42 a</b>	0,48 b	0,1895 a
UFV-Y7	20,0 a	2,62 b	1,36 b	0,44 b	0,1574 a
TEST	20,5 a	2,66 b	1,14 b	0,44 b	0,1569 a
<b>CV (%)</b>	<b>6,344</b>	<b>8,172</b>	<b>14,859</b>	<b>18,005</b>	<b>14,844</b>

Médias seguidas da mesma letra, para cada variável, não diferem estaticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, comprovou-se a promoção de crescimento de mudas de *P. taeda*, quando o substrato foi inoculado com isolados de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

A seleção dos melhores isolados foi estabelecida e baseada em médias de altura da parte aérea, que diferenciaram significativamente das mudas-testemunha e que apresentaram índice de qualidade de Dickson acima do preestabelecido. Os isolados que não foram selecionados poderão ser utilizados em testes futuros.

Dentre os 99 isolados testados nos ensaios de seleção, seis (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 e UFV-G4) influenciaram positivamente a qualidade das mudas, ou seja, cerca de 6% do total de isolados de rizobactérias apresentaram efeitos de PGPR. Esses resultados estão compatíveis com os dados obtidos por Teixeira (2001), que constatou que aproximadamente 10% dos isolados obtidos da rizosfera de eucalipto foram eficientes quanto à indução da rizogênese e na promoção de crescimento de mudas.

Em outros trabalhos de seleção de isolados para outras culturas, o porcentual de rizobactérias benéficas variaram de 1 a 5% (KLOEPPER et al., 1980; BURR, CAESAR, 1984). Embora ainda não se conheçam as causas dessas variações, acredita-se que o uso de substrato obtido de compostagem, utilizado para produção das mudas, possa favorecer a predominância de microrganismos benéficos, incluindo as rizobactérias (HOITINK; FAHY, 1986; TEIXEIRA, 2001).

A maioria das rizobactérias benéficas isoladas pertence aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, e com menor frequência aos gêneros *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, entre outros (BENIZRI et al., 2001).

Em estudos conduzidos por Shishido et al. (1995) e por Bal e Chanway (2000), foram obtidos isolados dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, a partir de solo da rizosfera de mudas e de florestas de *P. contorta* var *latifolia* (Dougl.) Engelm.

As menores médias observadas para mudas do primeiro e segundo ensaios podem ser explicadas em função da época de semeadura e o desenvolvimento das mudas terem ocorrido em períodos mais frios, devendo ser ressaltado que as mudas do terceiro e quarto ensaios de seleção ocorreram em período mais quente. Segundo Carneiro (1995), o ideal é que as sementes de *Pinus* sp. sejam semeadas na primavera, geralmente na segunda quinzena de setembro até final de outubro. Nessa época, a velocidade de emergência de plântulas é maior e o risco de ataque de fungos patogênicos é menor (ENEBAK et al., 1998). Considerando-se que ocorram melhores condições para o crescimento e desenvolvimento das plantas, espera-se que haja também maior efeito da aplicação de rizobactérias benéficas.

A aplicação de diferentes isolados de rizobactérias, em especial os da terceira seleção no substrato para produção de mudas de *P. taeda*, resultou no aumento da altura da parte aérea das plantas e dos pesos de matéria seca de raiz e da parte aérea. Segundo Carneiro (1995), a altura de mudas não deve ser considerada como variável isolada para

expressar a qualidade de mudas, principalmente se não houver equilíbrio adequado entre a parte aérea e o sistema radicular.

Assim, empregou-se o índice de qualidade de Dickson (DICKSON et al., 1960), por ser capaz de prever a qualidade das mudas antes de seu plantio definitivo no campo. O índice é uma combinação de variáveis morfológicas, e quanto maior o seu valor, melhor a qualidade das mudas. Hunt (1990) recomendou o índice de qualidade de Dickson (IQD) e, com base em resultados de trabalhos de pesquisa, estabeleceu o valor mínimo de 0,20 como sendo bom indicador da qualidade das mudas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (douglas-fir) e *Picea abies* L. (norway-spruce), crescidas em recipientes com capacidade para 50 ou 60 mL. No presente trabalho, foram encontrados valores bem superiores a esse índice, apesar de não ter ocorrido diferença significativa para as mudas desenvolvidas na presença de seis isolados utilizados.

Esses isolados foram selecionados para realização de estudos futuros que procurarão viabilizar o uso comercial de rizobactérias promotoras do crescimento para produção de mudas de *Pinus*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que dentre as 99 rizobactérias testadas, os isolados UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-G2, UFV-G4, UFV-F3 e UFV-AL9 foram selecionados por promoverem ganhos que variaram de 10 a 16% no crescimento em altura da parte aérea das mudas e por apresentarem índice de qualidade de Dickson entre 0,19 e 0,61.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAL, A. S.; CHANWAY, C. P. Isolation and identification of endophytic bacteria from lodge pole pine and western red cedar. In: INTERNATIONAL PGPR WORKSHOP, 5., 2000, Cordoba. **Proceedings...** Cordoba, Argentina: 2000.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 557-574, 2001.

BENT, E.; BREUIL, C.; ENEBAK, S. A.; CHAWAY, C. P. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* [Dougl. Engelm.]) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions. **Plant and Soil**, v. 241, p.187-196, 2002.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C. P.; ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 793-800, 2001.

BURR, T. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 2, p. 1-20, 1984.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; Campos: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1995. 451 p.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p.10-3, 1960.

ENEBAK, S. A. Plant growth promoting rhizobacteria as an alternative treatment for methyl bromide. Auburn University, Southern Forest Nursery Management Cooperative. **Research Report**, p. 98-104, 1998.

ENEBAK, S. A.; CAREY, W. A. Plant growth-promoting rhizobacteria induced systemic resistance to fusiform rust in naturally inoculated loblolly seedlings. **Southern Journal of Applied Forestry**, v. 28, p.185-188, 2004.

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatística e Genética)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Disponível em: < [www.fao.org](http://www.fao.org) >. Acesso em: 18 jul. 2006.

HOITINK, H. A.; FAHY, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review Phytopathology**, v. 24, p. 93-114, 1986.

HUNT, R. **Basic growth analysis**. Unwin Hyman, London: United Kingdom, 1990. 112 p.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KLOEPFER, 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.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 39-44, 1989.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do *Pinus* no Brasil**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 160 p.

KUNC, F.; MACURA, J. Mechanism of Adaptation and Selection of Microorganism in the Soil. In: VANCURA, V.; KUNC, F. (Eds.). **Soil microbial association**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 281-299.

MAFIA, R. G. **Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto**. 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

PROBANZA, A.; MATEOS, J. L.; LUCAS GARCÍA, J. A.; RAMOS, B.; FELIPE, M. R. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 140-148, 2001.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p.1376-1381, 1982.

SHISHIDO, M.; LOEB, B. M.; CHANWAY, C. P. External and internal root colonization of lodge pole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 707-713, 1995.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-*Cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp.** 2001. 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

TEIXEIRA, D. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. FERREIRA, E. M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 350-356, 2005.

## **AValiação DA ESPECIFICIDADE DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Pinus* sp.**

RESUMO – Testou-se a especificidade das rizobactérias promotoras em mudas de *P. taeda* L., *P. oocarpa*, *P. elliottii* Engelm. e *P. caribaea* var. *hondurensis*. Os isolados de rizobactérias UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2, UFV-G4, UFV-UFV-Z1, UFV-F6 e UFV-X2 foram inoculados por meio da aplicação de inóculo em substrato de produção de mudas. Aos 150 dias de semeadura, avaliaram-se o peso de matéria seca de raízes e da parte aérea das mudas, bem como o índice de qualidade de Dickson. Foram constatadas interações significativas para os isolados e as diferentes espécies de pinus. Os incrementos da biomassa da parte aérea e do sistema radicular variaram conforme o isolado e a espécie de pinus, porém, de modo geral, foram observados maiores médias para as mudas de *P. taeda*. As mudas de *P. taeda*, inoculadas com os isolados UFV-Z1 e UFV-AM5, apresentaram ganhos significativos de biomassa da parte aérea, do sistema radicular e do índice de qualidade de Dickson. Para mudas de *P. elliottii*, observou-se também aumento significativo da biomassa da parte aérea, quando inoculadas com o isolado UFV-AM5, e do sistema radicular com os isolados UFV-X2, UFV-G2 e UFV-AM5. O isolado UFV-AM5 não se mostrou específico para essas variáveis, nas duas das quatro espécies estudadas (*P. taeda* e *P. elliottii*).

Palavras-chave: *Pinus* sp., rizobactérias, especificidade e colonização.

## **SPECIFICITY EVALUATION OF RHIZOBACTERIAS ISOLATED FROM DIFFERENT SPECIES OF *Pinus* sp.**

ABSTRACT – The main objective of this paper was to test plant growth promoting rhizobacteria isolated from *P. taeda* specificity on other pinus species (*P. elliottii*, *P. oocarpa* e *P. caribaea hondurensis*). The rhizobacterias isolated UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2, UFV-G4, UFV-Z1, UFV-F6 e UFV-X2 were directly applied on the sowing substrate. After 150 days of sowing, seedling height, stem diameter and roots and aerial part dry matter weight, as well as Dickson's quality index were evaluated. Significantly interactions among strains and different pine species were observed. Aerial part and root dry matter varied according to the strain and pine species, but generally the highest averages were presented on *P. taeda* seedlings. The *P. taeda* seedlings when inoculated with UFV-Z1 and UFV-AM5 strains presented

significantly differences for all variables. For *P. elliotii* the seedlings inoculated with strains UFV-X2, UFV-G2 and UFV-AM5, and only UFV-AM5 increase aerial part and root biomass respectively. Strain UFV-AM5 did not show especificity for these variables in two of the four analyzed species (*P. taeda* e *P. elliotii*).

Keywords: *Pinus* sp., rhizobacterias, specificity and colonization.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores áreas plantadas com coníferas do mundo, o que, aliado à riqueza das suas características edafoclimáticas, proporciona uma vantagem sobre outras nações produtoras (NEVES et al., 2001). A área plantada com *Pinus* spp. ocupa aproximadamente 2.220.000 ha, para atender à demanda de matéria-prima para produção de celulose, fabricação de móveis, chapas de composição e goma-resina (FAO, 2006)

A produção de mudas de pinus, ao contrário à do eucalipto, ainda não sofreu grandes avanços tecnológicos. Atualmente, além da baixa tecnologia, o tempo necessário para formação das mudas é relativamente grande. Portanto, inovações que permitam maior eficiência no processo de produção de mudas é de grande importância. Neste contexto, tem sido estudado que a inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas pode promover aumento do crescimento e melhoria na qualidade de mudas de pinus (CHANWAY, 1997; BENT, 2000; ENEBAK; CAREY, 2004; ENEBAK, 2005).

Antes de 1989, eram raros os estudos referentes à promoção de crescimento de mudas de gimnospermas com o uso de rizobactérias (PROBANZA et al., 2002). Dentre esses, Parker e Dangerfield (1975) e Pkojska-Burdziej (1982) estudaram os efeitos da rizobacterização em sementes de *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii*, respectivamente. Desde então, aumentou-se o interesse nesse tipo de estudo para coníferas, englobando várias espécies de *Pinus*, *Picea*, *Tsuga* e *Pseudotsuga* (CHANWAY; HOLL, 1992; LEYVAL; BERTHELIN, 1993; CHANWAY, 1995, ENEBAK, 2005).

O efeito no crescimento pode ser afetado pela interação entre isolados de rizobactérias e genótipos da planta de interesse. Essa especificidade pode estar relacionada com a coexistência natural da planta hospedeira/bactéria ou com o compartilhamento metabólico entre plantas hospedeiras e bactérias, que independe de

sua coexistência prévia (HOLL; CHANWAY, 1992; CHANWAY et al.,1988). Rizobactérias isoladas de espécies de diferentes plantas podem exibir especificidade na promoção biológica do crescimento (ENEBAK et al., 1998).

No Brasil não há estudos sobre a influência de rizobactérias sobre a promoção do crescimento de mudas de coníferas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a especificidade de rizobactérias isoladas de mudas de *P. taeda* quanto à promoção de crescimento em espécies de pinus (*P. taeda*, *P. elliottii*, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no viveiro de pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

### 2.1. Espécies e procedências das sementes de pinus

As sementes utilizadas foram adquiridas nas seguintes empresas: *P. taeda* L. e *P. elliotti* Engelm., Klabin Florestal Paraná (Área de Produção de Sementes, Telêmaco Borba - Paraná); *P. oocarpa*, Duratex Florestal S.A. (Pomar de Sementes Clonal, Fazenda Monte Alegre, Agudos – São Paulo); e *P. caribaea* var. *hondurensis*, *International Paper* (Pomar de Sementes AMCEL/2, Morada Nova de Minas – Minas Gerais).

### 2.2. Rizobactérias testadas

Testaram-se os isolados UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2, UFV-G4, UFV-Z1, UFV-F6 e UFV-X2, pré-selecionados. As rizobactérias selecionadas foram testadas para *P. elliottii*, *P. oocarpa* e *P. caribaea hondurensis* e para *P. taeda*, no estudo da interação entre isolados de rizobactérias e espécies de pinus.

### 2.3. Produção de inóculo e rizobacterização do substrato

Para produção de inóculo, cada isolado de rizobactéria foi cultivado, separadamente, em placa de Petri, com o meio recomendado por Kado e Heskett (1970). Após incubação por 24 h, a 28 °C, no escuro, procedeu-se à raspagem do crescimento das rizobactérias, utilizando-se solução salina (NaCl, 0,85%). A densidade ótica de cada

suspensão foi ajustada para 0,2 de absorvância em 540 nm, o que corresponde, aproximadamente, a  $10^8$  u.f.c./mL, conforme a correlação entre densidade ótica e número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.), com base em Teixeira (2001).

O inóculo foi aplicado ao substrato de produção de mudas (Plantmax<sup>®</sup>), na proporção de 0,1 mL/cm<sup>3</sup> de substrato antes da semeadura, em tubetes de 50 cm<sup>3</sup>. Um substrato umedecido com solução salina autoclavada na mesma proporção serviu como testemunha. Além da inoculação com os isolados de rizobactérias, realizou-se a aplicação de acículas picadas de *Pinus*, como fonte inicial de fungos micorrízicos, na proporção de 1:6 (p/p).

#### **2.4. Semeadura, adubação do substrato e condução do experimento**

Os tratamentos constaram da inoculação de mudas de *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliotti* e *P. caribaea* var. *hondurensis* cultivadas em tubetes com 50 cm<sup>3</sup> de substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, com cada um dos isolados de rizobactéria separadamente. Foi mantido um controle sem inoculação.

As sementes de *P. taeda* foram previamente submetidas à quebra de dormência, por meio da estratificação em areia umedecida a 10 °C, por 26 dias.

A semeadura foi realizada diretamente nos tubetes, e aos 20 dias realizou-se o raleio, deixando-se apenas uma muda vigorosa no centro de cada tubete. Os tubetes foram inicialmente mantidos em casa de sombreamento (50% de luminosidade natural), acondicionados em bandejas planas com capacidade para 1.200 tubetes, suspensas a 80 cm do solo. Imediatamente após ao raleio das plântulas, estas foram transferidas para casa de vegetação, coberta com lona plástica transparente, com uma abertura lateral.

A ocupação das bandejas nos primeiros 30 dias foi de 100%, deixando-se apenas uma linha vazia entre cada repetição. Após esse período, as mudas foram espaçadas para capacidade de 50% da bandeja.

A irrigação das mudas e os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendações específicas para produção de mudas de pinus.

A adubação de base do substrato foi feita com 10 kg de NPK (20-0-20) e 4 kg de Fosmag 400<sup>®</sup> (fosfato magnésiano) por m<sup>3</sup> de substrato. A adubação de formação iniciou-se aos dez dias após a operação de raleio, em intervalos de 15 dias, com aplicação de 5 mL de solução, contendo 25 kg de superfosfato simples, 11 kg de sulfato de amônia e 5 kg de cloreto de potássio em 1.000 L de água.

## 2.5. Delineamento experimental

Os tratamentos constituíram um arranjo fatorial 4 x 10, envolvendo quatro espécies de pinus (*P.taeda*, *P.oocarpa*, *P.elliottii* e *P.caribaeae*) e dez tratamentos de inoculação, sendo nove isolados de rizobactéria e uma testemunha sem inoculação. O delineamento foi inteiramente casualizado, e foram mantidas cinco repetições por tratamento, cada uma constituída de 20 unidades amostrais.

## 2.6. Obtenção e análise dos dados

Aos 150 dias após semeadura, avaliaram-se a altura da parte aérea e o diâmetro do coleto, bem como o peso de matéria seca das raízes e da parte aérea das mudas. A determinação do peso de matéria seca foi realizada após a separação da parte aérea do sistema radicular e secagem em estufa a 70 °C, até o material atingir peso constante. Os dados obtidos foram utilizados para cálculo do índice de qualidade de Dickson (IQD) (DICKSON, 1960), cuja fórmula é:

$$IQD = (PMSPA+PMSR) / ((APA/DC)+(PMSPA / PMSR))$$

em que

APA = altura da parte aérea da muda do colo até a ponta do broto mais alto (cm);

DC = diâmetro do coleto (na altura do colo da planta) (mm);

PMSPA = peso de matéria seca da parte aérea (g); e

PMSR = peso de matéria seca de raízes (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F, a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (a 5% de probabilidade). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAEG (EUCLYDES, 1983).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Especificidade dos isolados de rizobactérias

Foram observados efeitos significativos para os isolados e as espécies de pinus, e a interação entre isolados de rizobactérias e espécies de pinus (Anexo 1). De modo geral, para todas as variáveis, as mudas de *P. taeda* apresentaram melhores resultados que as demais espécies. Para as mudas de *P. elliottii* foram observados incrementos do

peso de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular para um e três isolados, respectivamente, no entanto, para o índice de qualidade de Dickson, não se observou diferença significativa dos isolados nessa espécie.

Independentemente dos tratamentos, foram observados melhores desempenhos de PMSPA para as mudas de *P. taeda*. Quando se estudou o efeito do isolado dentro de cada espécie, somente foi observada diferença significativa para os *P. taeda*, com as maiores médias obtidas para as mudas desenvolvidas nos tratamentos com os isolados UFV-Z1e UFV-AM5 e as menores, para os isolados UFV-G4 e UFV-F6 (Quadro 1).

**Quadro 1** – Médias dos pesos de matéria seca da parte aérea de mudas de *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* e *P. caribaea* var. *hondurensis* aos 150 dias após semeadura  
**Table 1** – Aerial part dry matter weight averages of *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* and *P. caribaea* var. *hondurensis* seedlings after 150 days of sowing

Rizobactéria	<i>P. taeda</i>	<i>P. oocarpa</i>	<i>P. elliottii</i>	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Média
UFV-X2	1,4284 bc A	0,4233 a B	0,3975 a B	0,3715 a B	<b>0,6552</b>
<b>UFV-Z1</b>	<b>1,8177 a A</b>	0,3198 a B	0,3352 a B	0,2227 a B	<b>0,6739</b>
UFV-AL9	1,4809 b A	0,3577 a B	0,3274 a B	0,2672 a B	<b>0,6083</b>
UFV-G2	1,2614 bcd A	0,3678 a B	0,396 a B	0,2441 a B	<b>0,5673</b>
UFV-G4	1,1025 d A	0,3197 a B	0,2399 a B	0,2164 a B	<b>0,4696</b>
UFV-AM2	1,4425 bcA	0,3034 a B	0,3011 a B	0,3335 a B	<b>0,5951</b>
UFV-F6	1,1018 dA	0,3257 a B	0,3435 a B	0,2485 a B	<b>0,5049</b>
UFV-F3	1,1664 cdA	0,3113 a B	0,3276 a B	0,2104 a B	<b>0,5039</b>
<b>UFV-AM5</b>	<b>1,7787 Aa</b>	0,3905 a B	<b>0,4818 a B</b>	0,2595 a B	<b>0,7276</b>
TEST	1,2519 bcdA	0,3481 a B	0,3551 a B	0,3348 a B	<b>0,5725</b>
<b>Média</b>	<b>1,38322</b>	<b>0,34673</b>	<b>0,35051</b>	<b>0,27086</b>	

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas nas colunas (rizobactérias) e maiúsculas nas linhas (espécies), diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a variável PMSR, de modo geral, também foram observados os melhores resultados para as mudas de *P. taeda* seguidas do *P. elliottii*, destacando-se os isolados UFV-Z1 e UFV-AM5 para o *P. taeda* e UFV-AM5, X2 e Z2 para o *P. elliottii* (Quadro 2).

Com relação ao IQD, as maiores médias das mudas foram observadas, independentemente dos isolados, para o *P. taeda*, e dentro dessa espécie destacaram-se os isolados UFV-Z1 e UFV-AM5, sendo as piores médias para os isolados UFV-F6, UFV-G4 e UFV-G2. Para as demais espécies, não se observou efeito significativo para essa variável (Quadro 3).

**Quadro 2** – Média dos pesos de matéria seca do sistema radicular de mudas de *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* e *P. caribae* var. *hondurensis*, aos 150 dias após semeadura

**Table 2** – Shoot averages of *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* and *P. caribae* var. *hondurensis* seedlings after 150 days of sowing

Rizobactéria	<i>P. taeda</i>	<i>P. oocarpa</i>	<i>P. elliottii</i>	<i>P. caribae</i> var. <i>hondurensis</i>	Média
UFV-X2	0,4974 ab A	0,3042 a B	<b>0,5483 ab A</b>	0,1648 a B	<b>0,3787</b>
UFV-Z1	<b>0,6717 a A</b>	0,2578 a C	0,4624 bc B	0,1572 a C	<b>0,3873</b>
UFV-AL9	0,5941 ab A	0,2819 a BC	0,4516 bc AB	0,2089 a C	<b>0,3841</b>
UFV-G2	0,4312 bc AB	0,2649 a BC	<b>0,5463 ab A</b>	0,1648 a C	<b>0,3518</b>
UFV-G4	0,3971 c A	0,2497 a AB	0,3309 c AB	0,2005 a B	<b>0,2946</b>
UFV-AM2	0,5027 ab A	0,2629 a BC	0,4154 bc AB	0,2002 a C	<b>0,3453</b>
UFV-F6	0,3846 c AB	0,1984 a BC	0,4739 abc A	0,1572 a C	<b>0,3035</b>
UFV-F3	0,4644 bc A	0,2401 a B	0,4518 bc AB	0,1696 a B	<b>0,3315</b>
UFV-AM5	<b>0,6643 a A</b>	0,278 a B	<b>0,6646 a A</b>	0,1757 a B	<b>0,4457</b>
TEST	0,4813 bc A	0,2262 a B	0,4898 abc A	0,2052 a B	<b>0,3511</b>
<b>Média</b>	<b>0,5088</b>	<b>0,02564</b>	<b>0,4835</b>	<b>0,1804</b>	

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas nas colunas (rizobactérias) e maiúsculas nas linhas (espécies), diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Quadro 3** – Índice de qualidade de Dickson de mudas de *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* e *P. caribae* var. *hondurensis*, aos 150 dias após semeadura

**Table 3** – Dickson's quality index averages of *P. taeda*, *P. oocarpa*, *P. elliottii* and *P. caribae* var. *hondurensis* seedlings after 150 days of sowing

Rizobactéria	<i>P. taeda</i>	<i>P. oocarpa</i>	<i>P. elliottii</i>	<i>P. caribae</i> var. <i>hondurensis</i>	Média
UFV-X2	0,6427 bcd A	0,1061 a B	0,145 a B	0,0883 a B	<b>0,245525</b>
UFV-Z1	<b>0,8845 a A</b>	0,0921 a B	0,1263 a B	0,0504 a B	<b>0,288325</b>
UFV-AL9	0,7917 abc A	0,0943 a B	0,1257 a B	0,0667 a B	<b>0,2696</b>
UFV-G2	0,5514 d A	0,099 a B	0,1389 a B	0,0536 a B	<b>0,210725</b>
UFV-G4	0,5132 d A	0,0888 a B	0,0884 a B	0,0595 a B	<b>0,187475</b>
UFV-AM2	0,6496 bcd A	0,0875 a B	0,1088 a B	0,0723 a B	<b>0,22955</b>
UFV-F6	0,4937 d A	0,0725 a B	0,2987 a AB	0,0527 a B	<b>0,2294</b>
UFV-F3	0,6162 cd A	0,0871 a B	0,1139 a B	0,0519 a B	<b>0,217275</b>
UFV-AM5	<b>0,8708 ab A</b>	0,1054 a B	0,1802 a B	0,0601 a B	<b>0,304125</b>
TEST	0,6356 cd A	0,0891 a B	0,1345 a B	0,0706 a B	<b>0,23245</b>
<b>Média</b>	<b>0,6649</b>	<b>0,0921</b>	<b>0,1460</b>	<b>0,0626</b>	

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas nas colunas (rizobactérias) e maiúsculas nas linhas (espécies), diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatada interação significativa entre isolados de rizobactérias e espécies de *Pinus* sp. De modo geral, dos nove isolados testados, apenas UFV-Z1 e UFV-AM5 destacaram-se dos demais, resultando em estímulo ao crescimento e aumento na qualidade de mudas de *P.taeda*.

Os dados indicam que, para todos os isolados, apenas as mudas de *P. taeda* apresentaram ganhos de peso seco radicular e da parte aérea e de índice de qualidade. Dessa forma, as rizobactérias obtidas de *P. taeda* não promoveram efeito significativo sobre o crescimento das mudas das outras espécies testadas, quando aplicadas no substrato para produção de mudas.

Embora seja bastante estudado, ainda não existe um consenso sobre a existência de especificidade das rizobactérias. Enebak (2005), ao inocular isolados obtidos de *P. taeda* em *P. taeda*, *P. elliottii* e *P. palustris*, constatou que a altura da parte aérea das mudas foi incrementada por cinco de oito isolados testados para mudas de *P. taeda* e em três para as de *P. elliottii*. No entanto, apenas um isolado incrementou a biomassa radicular em *P. taeda*. O autor verificou ainda que a especificidade das bactérias inoculadas em mudas de pinus existe e pode ser evidenciada em viveiros de produção de mudas. Porém, a especificidade não deve ser analisada isoladamente, pois outros fatores podem estar relacionados com essa incompatibilidade, como: dose da bactéria inoculada e interferência de alguns patógenos preexistentes no substrato que podem afetar o crescimento (VONDERWELL; ENEBAK, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado existência de especificidade de resposta de espécies arbóreas a rizobactérias, portanto isolados promotores de crescimento em uma espécie de planta podem não ser efetivos para outras (SCHROTH; HANCOCK, 1982; CHANWAY; HOLL, 1993). Diferenças na quantidade e qualidade de exsudados radiculares de diversas espécies de plantas, bem como de cultivares e genótipos de uma mesma espécie, têm sido relatadas como a causa dessas variações (BALDANI; DOBEREINER, 1980).

Outra importante variável na avaliação da qualidade das mudas, utilizadas neste estudo, foi o índice de qualidade de Dickson. Mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* apresentaram valores superiores ao recomendado, enquanto as de *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis* foram inferiores, independentemente do tratamento com rizobactérias. Pode-se observar também que as mudas que apresentaram maiores índices

de qualidade também obtiveram ganho de peso de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, mostrando que houve correlação entre as variáveis e o índice empregado.

Segundo Johnson e Cline (1991), o índice de qualidade de Dickson (IQD) é uma medida morfológica integrada, e o valor mínimo considerado padrão para mudas produzidas em tubetes de 50 ou 60 mL, recomendado por Hunt (1990), é de 0,20. Os baixos valores obtidos no presente estudo podem estar ligados às condições ambientais de experimentação não-otimizadas para produção de mudas de cada espécie.

O índice de qualidade de Dickson é um bom indicador da qualidade das mudas, pois são considerados, para o seu cálculo, o vigor e o equilíbrio da distribuição da biomassa na muda, ou seja, ele pondera os resultados de várias variáveis. As variáveis morfológicas e os índices utilizados para avaliação da qualidade das mudas podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto para classificação do padrão da qualidade de mudas, desde que sejam utilizados em mudas desenvolvidas em condições de ambiente semelhantes (FONSECA, 2000).

Como os estudos de especificidade de rizobactérias obtidos de mudas de *P. taeda* são escassos, é necessário realizar estudos para que se obtenham isolados que não sejam específicos para diferentes espécies de *Pinus* sp., o que viabilizaria a produção e a utilização dessas rizobactérias em nível comercial.

## 5. CONCLUSÕES

- Dentre nove isolados testados quanto à especificidade em quatro espécies de *Pinus*, apenas o isolado UFV-AM5 não se mostrou específico para as variáveis biomassa de parte aérea e sistema radicular, para duas das quatro espécies estudadas (*P. taeda* e *P. elliottii*).
- Os incrementos em biomassa de parte aérea e do sistema radicular e no índice de qualidade de Dickson variaram conforme o isolado e a espécie de pinus, porém, de modo geral, observaram-se maiores médias para *P. taeda*.
- As mudas de *P. taeda*, inoculadas com os isolados UFV-Z1 e UFV-AM5, apresentaram, respectivamente, ganhos de 45 e 42% de biomassa da parte aérea, 39 e 38% do sistema radicular e 39 e 37% do índice de qualidade de Dickson.

- Nas mudas de *P. elliotii*, o aumento da biomassa da parte aérea foi de 35%, para isolado UFV-AM5, e de 11% da biomassa do sistema radicular, para os isolados UFV-X2 e UFV-G2, e de 37% para o UFV-AM5.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.

BENT, E. **The effect of other rhizosphere microorganisms on the ability of *Paenibacillus* spp. to promote the growth of lodgepole pine [*Pinus contorta* var. *latifolia* (Dougl. Engelm.)]**. 2000. Thesis (Ph.D.) – University of British Columbia, British Columbia, Vancouver, 2000.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases e Protection**, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.

CHANWAY, C. P. Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growthpromoting *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology Biochemistry**, v. 27, p. 767-775, 1995.

CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v. 43, p. 99-112, 1997.

CHANWAY, C. P.; HOLL, F. B. Ecotypic specificity of spruce emergence-stimulating *Pseudomonas putida*. **Forest Science**, v. 39, p. 520-527, 1993.

CHANWAY, C. P.; HOLL, F. B. Influence of soil biota on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1025-1031, 1992.

CHANWAY, C. P.; HOLL, F. B.; TURKINGTON, R. Genotypic coadaptation in growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. **Plant and Soil**, v. 106, p. 281-284, 1988.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.

ENEBAK, S. A. Rhizobacteria Isolated from loblolly pine seedlings mediate growth-promotion of greenhouse-grown loblolly, slash, and longleaf pine seedlings. **Forest Science**, v. 51, n. 6, p. 541-545, 2005.

ENEBAK, S. A., WEI, G., KLOEPPER, J. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v. 44, n. 1, p. 139-144, 1998.

ENEBAK, S. A.; CAREY, W. A. Plant growth-promoting rhizobacteria induced systemic resistance to fusiform rust in naturally inoculated loblolly seedlings. **Southern Journal of Applied Forestry**, v. 28, p.185-188, 2004.

FONSECA, E. P. **Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume., *Cedrela fissilis* Veli. e *Aspidosperma polyneuron* Muil Arg. produzidas sob diferentes períodos de sombreamento.** 2000. 113 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: < www.fao.org>. Acesso em: 18 jul. 2006.

HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P. Rhizosphere colonisation e seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 303-308, 1992.

HUNT, G. A. Effect of styroblock design e cooper treatment on morphology of conifer seedlings. In: TARGET SEEDLING SYMPOSIUM, MEETING OF THE WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATIONS, GENERAL TECHNICAL REPORT RM-200. 1990, Roseburg. **Proceedings...** Fort Collins: United States Department of Agriculture, Forest Service, 1990. p. 218-222.

JOHNSON, J. D.; CLINE, P. M. Seedling quality of southern pines. In: DUREYA, M. L., DOUGHERTY, P. M. (Eds.). **Forest regeneration manual**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.143-162.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radish. In: INTERNATIONAL CONFERENCE PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 3., Tours: Gilbert-Clarey, 1978. v. 2. p. 879-882.

LEYVAL, C.; BERTHELIN, J. Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. **Biology e Fertility of Soils**, v. 15, p. 259-267, 1993.

NEVES, G. A.; MARTINS, C. A.; MIYASAVA, J.; MOURA, A. F. Análise econômico-financeira da exploração de *pinus* resinífero em pequenos módulos rurais. Monografia apresentada ao **PENSA** - Programa de Estudos dos Negócios do Sistema Agroindustrial (USP). Sorocaba, São Paulo, 2001. 57 p.

PARKER, A. K.; DANGERFIELD, J. A. Influence of bacterial inoculations on growth of containerized Douglas fir seedlings. **Can. For. Serv. Bimonth. Res. Notes**, v. 31, p.14-15, 1975.

POKOJSKA-BURDZIEJ, A. The effect of microorganisms, microbial metabolites and plant growth regulators (IAA and GA 3) on the growth of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). **Polish Journal of Soil Science**, v. 15, p. 137-143, 1982.

PROBANZA, A.; LUCAS GARCÍA, J. A.; RUIZ PALOMINO, M.; RAMOS, B.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). **Applied Soil Ecology**, v. 20, p. 75-84, 2002.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p. 1376-1381, 1982.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-Cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp.** 2001. 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

VONDERWELL, J.; ENEBAK, S. A. Differential effects of rhizobacteria strain and dose on the ectomycorrhizal colonization of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 46, p. 437– 441, 2000.

## **COLONIZAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE RAÍZES DE MUDAS DE *Pinus taeda***

RESUMO – No presente trabalho objetivou-se testar a capacidade dos isolados de rizobactérias promotoras de crescimento UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2, UFV-G4, UFV-Z1, UFV-F6 e UFV-X2 colonizarem raízes de *P. taeda* e a desses isolados solubilizarem fosfatos. Para observar a capacidade de colonização das rizobactérias, sementes de *P. taeda* foram microbiolizadas e inoculadas em meio ágar-água. A avaliação foi realizada visualmente, 30 dias após a semeadura, considerando-se que a presença de colônia turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz demonstra a formação de colônia de rizobactérias. Para testar a solubilização de fosfatos, discos de papel-filtro rizobacterizados foram inoculados em meio com precipitado de  $\text{CaHPO}_4$ . A bactéria foi avaliada como solubilizadora de fosfato, quando houve a formação de halo ao redor das colônias que solubilizaram fósforo. Todos os nove isolados testados apresentaram capacidade de colonização *in vitro*, porém apenas o isolado UFV-AM5 apresentou a formação de halo no meio de cultura, demonstrando assim resultado positivo para a solubilização de fosfatos *in vitro*.

Palavras-chave: *Pinus* sp., rizobactérias, solubilização fosfatos e colonização raízes.

## **COLONIZATION AND PHOSPHATES SOLUBILIZATION BY ISOLATED RHIZOBACTERIAS OF *Pinus taeda* SEEDLING ROOTS**

ABSTRACT – The aim of this study was to test the capacity of plant growth promoting rhizobacterias (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F6, UFV-G2, UFV-G4, UFV-Z1, UFV-F3 e UFV-X2) on colonize *P. taeda* roots and their ability to solubilize phosphates. To observe the rhizobacterias colonization ability, *P. taeda* seeds were microbiolized and inoculated on water-agar medium. After 30 days after sowing, the presence of a white and opac muco around the roots indicated the root colonization. To test phosphates solubilization, microbiolized paper disks were inoculated on medium with  $\text{CaHPO}_4$  precipitate. The evaluation of phosphate solubilizers was based on the formation of visible clear halo/zone around the paper disks on agar plates. All the nine rhizobacterias strains showed ability to colonize *in vitro* *P. taeda* roots but, among them, only strain UFV-AM5 showed a clear zone on agar plate, concluding a positive result on phosphates solubilization.

Keywords: *Pinus* sp., rhizobacterias, phosphorus solubilization, root colonization.

## 1. INTRODUÇÃO

A rizosfera, como definido por Hiltner (1904), citado por Lynch (1990), é a região do solo sob influência das raízes. Uma extensiva colonização é essencial para alcançar o eficiente controle biológico e estimular o crescimento das plantas.

A colonização da rizosfera deve-se à maior disponibilidade de nutrientes em relação ao solo não-rizosférico. Esta disponibilidade é resultado da translocação de fotossintatos da parte aérea das plantas, via floema, para as raízes, onde sustentam os processos biossintéticos, sendo uma parte liberada para o solo rizosférico.

O efeito da rizosfera sobre as bactérias não é específico, havendo a presença de diferentes grupos morfológicos, fisiológicos e taxonômicos. Entretanto, as bactérias gram-negativas compõem uma grande porcentagem da rizosfera, devido às suas altas taxas de crescimento, pois respondem à adição de ácidos aminados e açúcares solúveis, produz ácido por adição de glicose e são resistentes a antibióticos (ALEXANDER, 1977).

Entre os elementos essenciais, o fósforo (P) ocupa posição de destaque em relação aos seres vivos, tendo em vista sua atuação estrutural e funcional e na transferência de energia (NAHAS, 1991). O fósforo é o segundo macronutriente mineral limitante para o crescimento de plantas e exerce papel importante no seu metabolismo, participa na transferência de energia, na respiração e na fotossíntese (GLICK et al., 1999).

Estima-se que microrganismos solubilizadores de fosfato podem constituir de 20 a 40% da população microbiana do solo e que significativa proporção pode ser isolada do solo rizosférico (KUCEY, 1983).

Esses microrganismos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas, fato que tem despertado a atenção para utilização desses microrganismos como inoculante comercial ou no manejo de suas populações como forma de promover uma melhor utilização do P existente no solo ou do adicionado como fertilizante. O uso desses microrganismos depende do conhecimento de suas características, entre as quais a capacidade de solubilização, que varia com o microrganismo e as condições do ambiente, sendo a habilidade de solubilização de fosfato por rizobactérias um dos mecanismos diretos de promoção de crescimento de plantas (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

Os isolados bacterianos que são capazes de disponibilizar fosfato para as plantas por meio da mineralização do fosfato orgânico, ou por solubilização do fosfato inorgânico através da produção de ácidos, são chamados de fosfobactérias ou bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB) e já são usados como biofertilizantes na agricultura (RODRÍGUEZ, 1999).

Dentre os grupos de microrganismos com comprovado potencial de benefício para as plantas, estão as bactérias solubilizadoras de fosfato (GULL et al., 2004) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (RAO; TAK, 2002), podendo beneficiar o desenvolvimento de mudas em viveiros, maximizando a capacidade de estabelecimento dessas mudas em campo. Além de solubilizar fosfato, essas bactérias podem atuar como *mycorrhiza helper bacteria* (MHB), melhorando o estabelecimento dos fungos micorrízicos (TORO et al., 1997), além de solubilizarem fosfatos através da liberação de ácidos orgânicos, produtos de seu metabolismo, favorecendo o desenvolvimento vegetal (GULL et al., 2004).

Visto que a interação das rizobactérias e plantas depende da colonização dessas em suas raízes, e que a absorção dos fosfatos se torna mais efetiva com a solubilização pelas rizobactérias, desenvolveu-se este trabalho com o objetivo de avaliar isolados de rizobactérias capazes de promover o crescimento de mudas de pinus, bem como a sua capacidade de colonizar as raízes e solubilizar fosfato inorgânico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Colonização de raízes

Para observar a capacidade de colonização das rizobactérias, preparou-se uma suspensão dos isolados de rizobactérias. Para isso, os isolados foram repicados para uma placa de Petri com meio MB1 (KADO; HESKETT, 1970), e após o crescimento por 24 h, a 28 °C, foi realizada uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85%, com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As sementes de *Pinus* sp. foram desinfestadas em hipoclorito (5%) por 1 minuto, microbiolizadas em suspensão de inóculo ( $10^8$  u.f.c/mL) e incubadas a 28 °C, no escuro, por 24 h. Após incubação, as sementes foram depositadas em meio contendo ágar-água (8 g/L).

A avaliação foi realizada visualmente, aos 30 dias após a semeadura, observando-se as raízes e considerando que a presença de massa bacteriana opaca de coloração esbranquiçada em volta das raízes indica a colonização das rizobactérias.

## 2.2. Solubilização de fosfato

Testaram-se os isolados UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2, UFV-G4, UFV-Z1, UFV-F6 e UFV-X2, que comprovaram eficiência em estimular o crescimento de mudas de *P. taeda*.

Os isolados foram repicados para uma placa de Petri com meio MB1 (KADO; HESKETT, 1970), e após o crescimento por 24 h, a 28 °C, foi realizada uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85%, com auxílio de uma alça de Drigalski.

Discos de papel-filtro (4 mm de diâmetro) autoclavados foram rizobacterizados em suspensão bacteriana e incubados por 24 h, a 28 °C, no escuro. Após incubação, os discos foram depositados em meio de cultura contendo a forma inorgânica de fosfato ( $\text{CaHPO}_4$ ). O precipitado desse meio foi obtido pela mistura de 50 mL da solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,54M (94 g/L) e 100 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$  0,90M (99 g/L) a 1.000 mL do meio GEL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). A testemunha foi composta apenas de solução salina.

Após incubação por 48 h, a 28 °C, no escuro, a bactéria foi avaliada como solubilizadora, ou não quando houve a formação de halo ao redor das colônias que solubilizaram fósforo.

## 3. RESULTADOS

Todos isolados testados foram capazes de colonizar as raízes de *P. taeda* (Quadro 1). A colonização pode ser identificada pelo crescimento da colônia, de aspecto mucoso opaco de cor esbranquiçada em volta das raízes (Figura 1). Dentre essas, apenas o isolado UFV-AM5 foi capaz de solubilizar fosfato *in vitro* (Quadro 1, Figura 2).

**Quadro 1** – Solubilização de fosfato e colonização de raízes de *P. taeda* inoculadas com rizobactérias isoladas de raízes de mudas de *P. taeda*

**Table 1** – Phosphorus solubilization and root colonization of rhizobacterias isolated from *P. taeda* seedlings

Isolado	Solubilização	Colonização
UFV-AL9	-	+
UFV-AM5	+	+
UFV-AM2	-	+
UFV-F3	-	+
UFV-G2	-	+
UFV-G4	-	+
UFV-Z1	-	+
UFV- F6	-	+
UFV- X2	-	+



**Figura 1** – Formação de colônia de rizobactéria ao redor de raízes *Pinus taeda* germinadas *in vitro*, após 30 dias de semeadura em meio de cultura água-ágar.

**Figure 1** – Rhizobacteria colony formation around *Pinus taeda* germinated *in vitro* on water-agar medium culture, after 30 days of sowing.



**Figura 2** – Solubilização de fosfato inorgânico ( $\text{CaHPO}_4$ ) pela rizobactéria UFV-AM5 em meio de cultura.

**Figure 2** – Rhizobacteria UFV-AM5 Inorganic phosphate solubilization on medium culture.

#### 4. DISCUSSÃO

A colonização de rizobactérias em raízes de *P. taeda* foi satisfatória, pois constatou-se a formação de muco opaco de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz. O estabelecimento bacteriano na rizosfera é fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta (CHANWAY et al., 2000). Uma extensiva colonização é essencial para alcançar o eficiente controle biológico e estimular o crescimento das plantas. A colonização da rizosfera deve-se à maior disponibilidade de nutrientes em relação ao solo não-rizosférico (WHIPPS, 2001).

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

O isolado de rizobactéria UFV-AM5 demonstrou capacidade de solubilizar fósforo (Figura 5). Segundo Richardson (1994), alguns microrganismos são capazes de solubilizar o fósforo não-disponível e aumentar o crescimento de plantas. A solubilização de fosfato pode ser uma das estratégias que a bactéria utiliza na promoção do crescimento das plantas. Todavia, a solubilização de fosfatos *in vitro* por microrganismos pode não representar o que ocorre *in vivo*. Richardson (2001) sugere que, apesar de os solubilizadores de fosfato apresentarem potencial de uso como inoculantes, sua ampla aplicação permanece limitada devido à falta de conhecimento sobre ecologia microbiana e dinâmica das populações no solo.

Souchie et al. (2005) verificaram que a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfatos foi benéfica para formação de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* e *Mimosa caesalpiniiifolia*.

#### 5. CONCLUSÕES

Todos os nove isolados testados foram capazes de colonizar raízes de *P. taeda*, porém apenas o isolado UFV-AM5 solubilizou fosfato *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 632 p.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London: Imperial College Press, 1999.

GULL, M.; HAFEEZ, F. Y.; SALEEM, M.; MALIK, K. A. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 6, p. 623-628, 2004.

HABE, M. H.; UESUGI, C. H. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 657-660, 2000.

HILTNER, L. Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. **Arbeiten Deutsch. Lanwirt-Ges**, v. 98, p. 59-78, 1904.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal Soil Science**, v. 63, p. 671-678, 1983.

LYNCH, J. M. **The rhizosphere**. Chichester: John Wiley & Sons, 1990.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. Efeito da adição ao solo de fosfato solúvel obtido por via microbiológica a partir de fluorapatita. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 33, n. 2, p. 225-229, 1991.

RAO, A. V.; TAK, R. Growth of different tree species and their nutrient uptake in limestone mine spoil as influenced by arbuscular mycorrhizal (AM) - fungi in Indian Arid zone. **Journal of Arid Environments**, v. 51, n. 1, p. 113-119, 2002.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2001.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 42-46, 2003.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

TORO, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability ( $P_{32}$ ) and nutrient cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4408-4412, 1997.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions e biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

## 5. ANEXOS

**Quadro 1A** – Quadro ANOVA mostrando a interação isolado de rizobactéria e espécie de pinus

*Table 1A – ANOVA table presenting the interaction among rhizobacterias and pine species.*

Fonte de Variação	Quadrado Médio	F	Sig.
<b>BIOMASSA PARTE AÉREA</b>			
Isolado	0,8751858E-01	4,94	**
Espécie de Pinus	13,01726	735,44	**
Isolado*Espécie de Pinus	0,5050082E-01	2,85	**
Resíduo	0,1769998E-01		
<b>BIOMASSA RAIZ</b>			
Isolado	0,3045275E-01	4,36	**
Espécie de Pinus	1,252636	179,21	**
Isolado*Espécie de Pinus	0,1665042E-01	2,38	**
Resíduo	0,6989834E-02		
<b>INDICE QUALIDADE DICKSON</b>			
Isolado	0,2145304E-01	2,00	**
Espécie de Pinus	3,994726	373,24	**
Isolado*Espécie de Pinus	0,2653516E-01	2,48	**
Resíduo	0,1070284E-01		

\*\* Significativo pelo teste de Tukey (5%).