



Revista Árvore

ISSN: 0100-6762

r.arvore@ufv.br

Universidade Federal de Viçosa  
Brasil

Gonçalves Mafia, Reginaldo; Couto Alfenas, Acelino; Maffia, Luiz Antônio; Ferreira, Eraclides Maria;  
Breda Binoti, Daniel Henrique; Siqueira, Leandro

Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto

Revista Árvore, vol. 33, núm. 5, septiembre-octubre, 2009, pp. 789-797

Universidade Federal de Viçosa

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48815853002>

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

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

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

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

# MICROBIOLIZAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO E CLONES DE EUCALIPTO<sup>1</sup>

Reginaldo Gonçalves Mafía<sup>2</sup>, Acelino Couto Alfenas<sup>3</sup>, Luiz Antônio Maffia<sup>3</sup>, Eraclides Maria Ferreira<sup>3</sup>, Daniel Henrique Breda Binoti<sup>4</sup> e Leandro Siqueira<sup>5</sup>

**RESUMO** – Os objetivos deste trabalho foram avaliar métodos de microbiolização e estudar a interação entre isolados de rizobactérias e clones de eucalipto. Analisaram-se três métodos de microbiolização: a) Adição de suspensão de rizobactérias a  $10^8$  ufc/mL no substrato (0,2 mL/cc); b) Imersão de miniestacas na mesma suspensão de inóculo; e c) Combinação dos dois tratamentos (a e b). Empregaram-se um clone híbrido de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) e isolados de rizobactérias (3918, FL2 e S1). Depois de 25 dias do estaqueamento, avaliaram-se o índice de enraizamento, a biomassa radicular e da parte aérea e a incidência de doenças. Em geral, não houve diferença entre os métodos de microbiolização, e todos os isolados aumentaram o enraizamento, a biomassa radicular e o controle biológico de *Cylindrocladium* spp. Em outro experimento, os resultados indicaram interação entre clones de eucalipto e isolados de rizobactérias para enraizamento e biomassa radicular.

**Palavras-chave:** Propagação clonal, enraizamento, biocontrole e PGPR.

## MICROBIOLIZATION AND INTERACTION BETWEEN GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA AND EUCALYPTUS CLONES

**ABSTRACT** – This work aimed to evaluate methods of microbiolization and interaction between isolates of rhizobacteria and eucalyptus clones. We have tested the following methods of microbiolization: a) Addition of suspension of rhizobacteria ( $10^8$  cfu/mL) to the substrate (0.2 mL/cc); b) Immersion of mini-cuttings in the inoculum suspension ( $10^8$  cfu/mL); and c) Combination of the two methods (a and b). Mini-cuttings of a hybrid clone of eucalyptus (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) and three (3918, FL2 and S1) rhizobacteria isolates were used. Twenty-five days after the mini-cuttings were planted, the rooting, root biomass and disease incidence were evaluated. In general, there were no significant differences between the microbiolization methods. All rhizobacterial isolates increased rooting, biomass and biocontrol of *Cylindrocladium* spp. In another experiment, the results showed interaction between eucalyptus clones and rhizobacteria isolates for the rooting index and root biomass.

**Keywords:** Clonal propagation, rooting, biocontrol and PGPR.

### 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as florestas de eucalipto ocupam aproximadamente três milhões de hectares e suprem, de modo racional e eficiente, a demanda por biomassa lenhosa com propriedades tecnológicas e silviculturais específicas de diversos setores industriais brasileiros,

notadamente o de papel e celulose, carvão vegetal e, mais recentemente, o de madeira serrada (ALFENAS et al., 2004).

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento e implementação das técnicas de miniestaquia e microestaquia, ocorreram grandes avanços tecnológicos

<sup>1</sup> Recebido em 02-10-2007 e aceito para publicação em 23.06.2009.

<sup>2</sup> Fibria Celulose S.A. Centro de Tecnologia. Aracruz, ES. E-mail: <rgoncalves@fibria.com.br>.

<sup>3</sup> Departamento de Fitopatologia UFV. Viçosa, MG. E-mail: <aalfenas@ufv.br>, <lammaffia@ufv.br> e <ferreiraem@yahoo.com.br>.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da UFV. Viçosa, MG. E-mail: <danielbinoti@yahoo.com.br>.

<sup>5</sup> Suzano Papel e Celulose. Divisão de Tecnologia Florestal. Teresina, PI. E-mail: <lsiqueira@suzano.com.br>.

na produção de mudas de eucalipto (TITON et al., 2003). No entanto, em determinados materiais genéticos, sobretudo nas fases iniciais de multiplicação, a ocorrência de baixos índices de enraizamento, aliada às possibilidades de ocorrência de doenças, constitui fator que ainda dificulta a clonagem do eucalipto em larga escala. Nesse sentido, foi demonstrado recentemente o efeito benéfico da aplicação de rizobactérias sobre o enraizamento, crescimento e biocontrole de doenças do eucalipto (MAFIA, 2005; TEIXEIRA et al., 2005), o que é uma estratégia promissora para otimização da produção de mudas.

O uso de rizobactérias para aumentar a produtividade de plantas tem sido extensivamente estudado há vários anos e em diversas culturas agrônomicas, como: batata, cana-de-açúcar, canola, amendoim, trigo, cevada, milho e tomate, entre outras (KLOEPPER, 1996). Em espécies arbóreas, as recentes investigações têm evidenciado resultados promissores (CHANWAY, 1997; ENEBACK et al., 1998; SHISHIDO e CHANWAY, 2000), embora ainda careçam de estudos que visem otimizar o processo de microbiolização. Além disso, é preciso avaliar as possibilidades de interação entre isolados de rizobactérias e genótipos da planta de interesse, conforme salientado por Kloepper (1996). A respeito da existência dessa interação, ainda não existem estudos conclusivos.

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar a especificidade entre isolados de rizobactérias e genótipos de eucalipto, bem como possíveis formas de microbiolização, considerando-se a rotina comercial de produção de mudas, os custos de produção do inoculante e a facilidade de aplicação.

## 2. MATERIALE MÉTODOS

### 2.1. Isolados de rizobactérias e preparo do inóculo

Empregaram-se cinco isolados de rizobactérias (FL2 - *Pseudomonas* sp.; S1, S2 e 3918 - *Bacillus subtilis*; e Ca - *Pseudomonas fulva*), obtidos a partir da rizosfera de mudas clonais de eucalipto de diferentes regiões do país. Esses microrganismos foram pré-selecionados de acordo com a capacidade em promover incremento na biomassa de raízes e induzir o enraizamento adventício (TEIXEIRA et al., 2007).

Para se proceder ao preparo do inóculo, cada isolado foi cultivado separadamente em meio solidificado de Kado e Heskett (1970), no escuro. Após 48 h, procedeu-se à raspagem das colônias de bactérias

em solução salina (NaCl 0,85%). A concentração de cada suspensão foi ajustada de acordo com a correlação entre a densidade ótica e o número de unidades formadoras de colônias (u.f.c./ml) para 0,2 Abs. (540 nm), o que corresponde a aproximadamente a  $10^8$  u.f.c./ml. As suspensões de inóculo foram mantidas sob refrigeração até o momento de serem utilizadas.

### 2.2. Interação entre isolados de rizobactéria e clones de eucalipto

Com o objetivo de verificar a possível interação entre isolados de rizobactérias e clones de eucalipto, foram realizados dois experimentos independentes. No primeiro ensaio, instalado em um viveiro localizado em Mucuri, BA, testaram-se os isolados FL2, 3918, S2, S1 e Ca nos clones 10, 1172, 2277 e 9882. O segundo experimento foi realizado em um viveiro instalado em Eunápolis, BA, no qual foram testados os clones 244, 830, 865 e 1006 e os mesmos isolados de rizobactérias. Em ambos os experimentos, as suspensões de rizobactérias foram adicionadas ao substrato de enraizamento constituído de casca de arroz carbonizada, composto de casca de pinus (Plantmax®) e vermiculita de granulometria fina (30:50:20), na proporção de 0,1 ml/cc de substrato e homogeneizadas em misturador apropriado. Como testemunha, realizou-se a aplicação de solução salina estéril, na mesma proporção. Após a microbiolização, o substrato de enraizamento foi enriquecido com Osmocote® (NPK = 19:06:10) e superfosfato simples, na proporção de 2 kg/m<sup>3</sup> (ALFENAS et al., 2004). Depois dessa etapa, miniestacas dos referidos clones foram coletadas de minijardins clonais, inseridas no substrato microbiolizado e postas a enraizar em casa de enraizamento com nebulização intermitente. Após 25 dias, avaliaram-se o índice de enraizamento e a biomassa seca de raízes para cada combinação isolado-clone. Para a primeira variável, quantificou-se o número de miniestacas enraizadas em relação ao total. A avaliação da biomassa radicular foi realizada após a remoção dos resíduos de substrato e secagem das raízes em estufa por 24 h a 70 °C.

### 2.3. Formas de veiculação

Os experimentos foram instalados em um viveiro localizado em Curvelo, MG, nos quais foram empregados três isolados de rizobactérias (3918, FL2 e S1) e um clone de eucalipto, em três experimentos independentes. Em todos os experimentos, os isolados de rizobactérias foram aplicados de três maneiras distintas: diretamente

no substrato; por imersão das miniestacas em suspensão de inóculo por 3 min; e pela combinação dos referidos métodos. Os demais procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente. As avaliações foram realizadas após 25 dias, quantificando-se o índice de enraizamento, a biomassa radicular e a incidência de doenças. Nesse último caso, as miniestacas não enraizadas foram coletadas e acondicionadas individualmente em sacos de papel e, em seguida, sob condições assépticas, desinfestadas superficialmente, por imersão em álcool 70%, por 30 s, e em hipoclorito de sódio (5%) por 3 min. Posteriormente, as miniestacas foram lavadas (3 x) em água esterilizada, transferidas para placas de Petri com ágar-água (2%) e incubadas a 27 °C, no escuro. Diariamente, realizou-se a avaliação, sob binocular estereoscópica, quanto à presença de estruturas típicas de patógenos associados à propagação clonal de eucalipto, como *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocladium* spp. e *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries.

#### 2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos sobre interação entre isolados de rizobactérias e clones de eucalipto foram montados, independentemente, em arranjo fatorial (5 isolados x 4 clones) e em delineamento inteiramente casualizado composto de seis repetições, cada uma constituída de 176 miniestacas. Na avaliação de formas de microbiolização, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com sete repetições, cada uma constituída de 176 miniestacas.

Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F a 5% de probabilidade, e, posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de enraizamento (E) foram transformados em  $\arcsen \sqrt{E/100}$  ou em  $\log(1/(1 - (E/100)))$ , para atendimento das pressuposições da análise de variância. Os dados de biomassa seca de raízes, quando necessários, foram transformados por raiz quadrada. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS V.8 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### 3. RESULTADOS

A interação entre isolados de rizobactérias e clones de eucalipto foi significativa ( $P < 0,05$ ) nos dois ensaios, para índice de enraizamento e biomassa seca de raízes. Desse modo, os incrementos variaram de acordo com

o isolado e clone de eucalipto, não sendo observado, em qualquer combinação, efeito deletério dos isolados sobre a rizogênese do eucalipto ou sobre o seu crescimento, expresso pela biomassa de raízes. No primeiro ensaio, na localidade de Mucuri, BA, o clone 1172 foi o que melhor respondeu ao processo de microbiolização, com um incremento médio de 15,4 e 166,3%, para índice de enraizamento e biomassa de raízes, respectivamente.

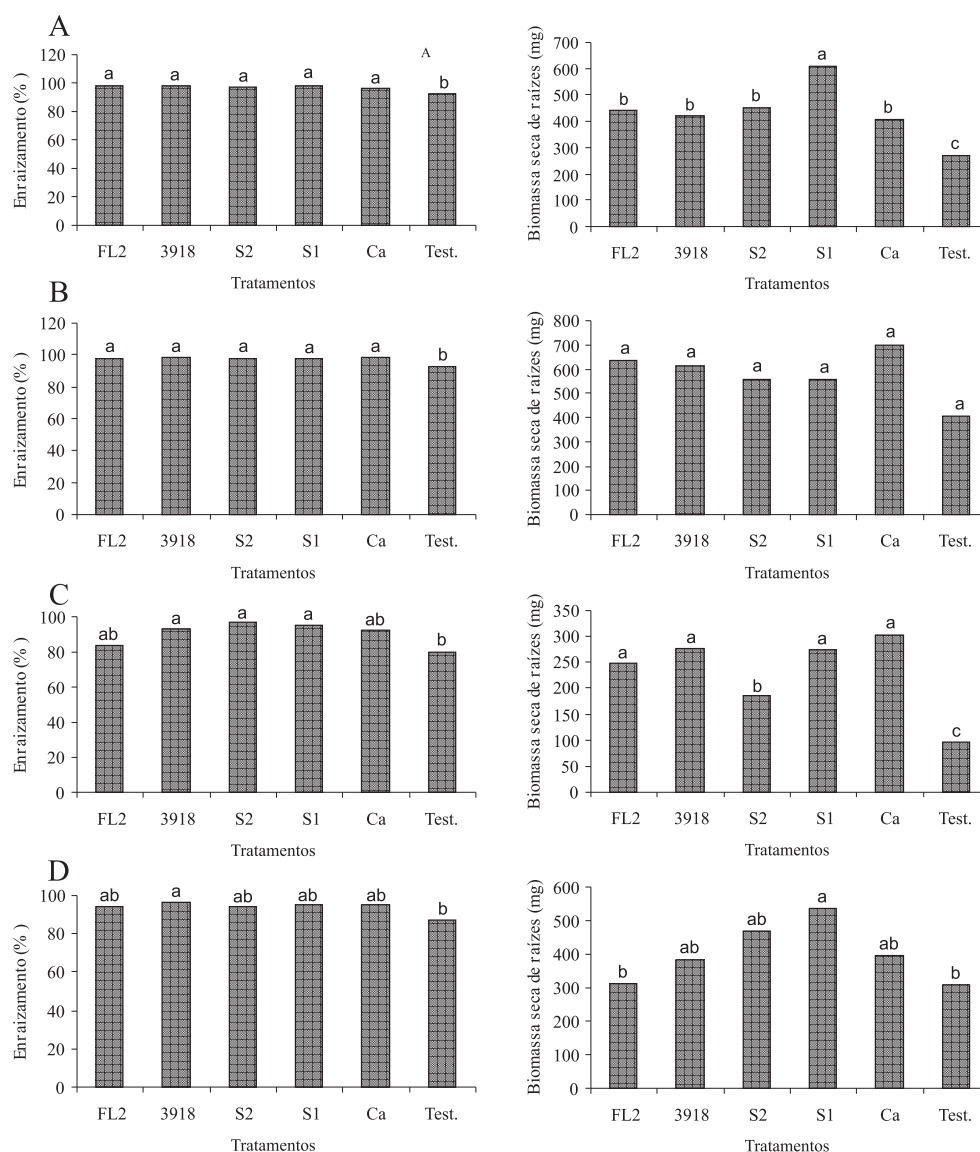
Nos clones 10 e 2277 (Figura 1AB), observou-se que todos os isolados promoveram incrementos no índice de enraizamento, em comparação com a testemunha. De forma geral, nos clones 1172 e 9882 (Figura 1CD) o isolado 3918 foi o mais efetivo. A melhor interação isolado-clone foi obtida no enraizamento com o tratamento do clone 1172 com o isolado S2, com incremento de 21,1%.

Em relação ao incremento de biomassa radicular, observou-se que somente os clones 2277 (Figura 1B) e 830 (Figura 2B) não responderam positivamente ao processo de microbiolização do substrato em relação a todos os isolados testados. Nos demais clones, assim como no enraizamento, as respostas variaram em relação aos diferentes tratamentos. No entanto, em geral o isolado S1 foi o mais efetivo para o incremento dessa variável. A melhor interação isolado clone foi obtida com a combinação do isolado 3918 e com o clone 1172, com ganhos percentuais de 187,6%.

No segundo experimento, em Eunápolis, BA, o clone 865 foi o que apresentou maiores ganhos com o processo de microbiolização, com incrementos percentuais de 24,6 e 72,6%, em relação ao índice de enraizamento e biomassa de raiz, respectivamente, quando comparado com a testemunha.

No clone 1006 não houve diferença entre os tratamentos para índice de enraizamento. Todavia, nos demais clones pelo menos um isolado diferiu da testemunha. Em geral, o isolado S2 foi o melhor tratamento (Figura 2A-D). A melhor interação isolado clone de eucalipto foi obtida com o isolado 3918 e o clone 865, com incremento percentual de 28,5%.

Em relação à biomassa radicular, as respostas também foram variáveis. No entanto, a melhor interação foi obtida com o tratamento do substrato de enraizamento com o isolado S1 e o clone 865, com incremento percentual de 134,0%.

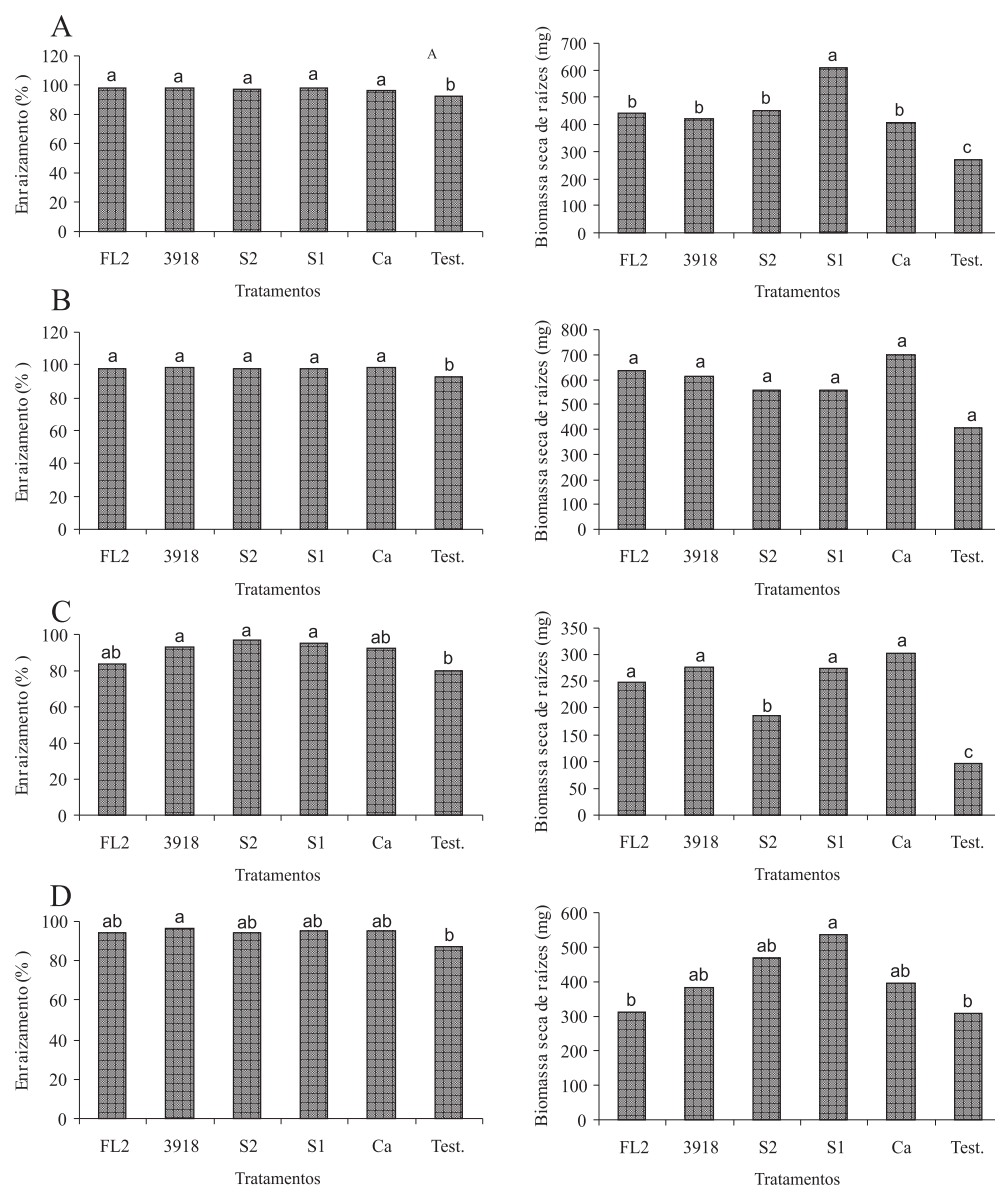


**Figura 1** – Índice de enraizamento e biomassa de raízes dos clones 10 (A), 2277 (B), 1172 (C) e 9882 (D) propagados em substrato microbiolizado com diferentes isolados de rizobactérias e não tratado (Test.). Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Figure 1** – Rooting index and root biomass of the clones 10 (A), 2277 (B), 1172 (C) and 9882 (D) in substrate treated with rhizobacteria isolates and control without microbiolization. Columns under the same letter did not differ statistically by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

De forma geral, não houve diferença entre as formas de aplicação dos isolados de rizobactérias para índice de enraizamento (Figura 3A), para biomassa radicular (Figura 3B) e para incidência de podridão de miniestacas

(Figura 3C), causada por *Cylindrocladium* spp. Em contrapartida, independentemente da forma de microbiolização, obtiveram-se incrementos em relação à testemunha. Para índice de enraizamento, o isolado

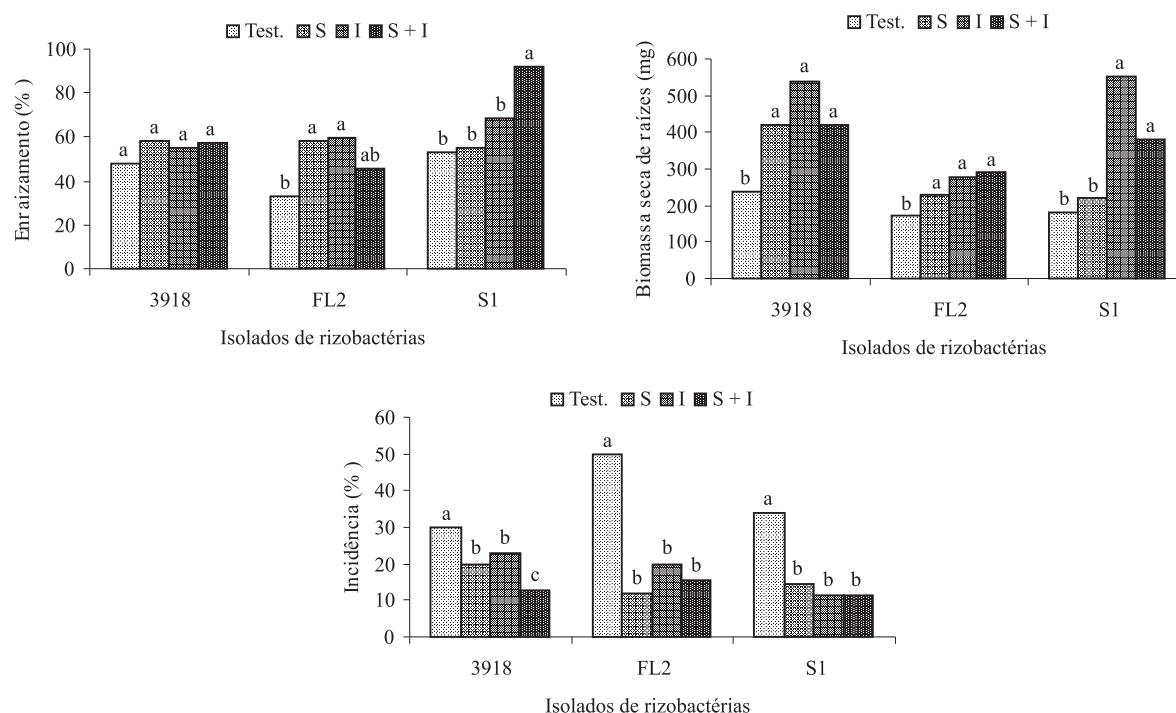


**Figura 2** – Índice de enraizamento e biomassa de raízes dos clones 244 (A), 830 (B), 865 (C) e 1006 (D) propagados em substrato microbiolizado com diferentes isolados de rizobactérias e não tratado (Test.). Colunas sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Figure 2** – Rooting index and root biomass of the clone 244 (A), 830 (B), 865 (C) and 1006 (D) in substrate treated with rhizobacteria isolates and control without microbiolization. Columns under the same letter did not differ statistically by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

S1 foi mais efetivo quando aplicado no substrato e por imersão das miniestacas. Em biomassa de raízes, no entanto, não houve diferença entre o método de imersão

e as duas formas de microbiolização. A incidência de podridão de miniestacas foi menor, no isolado 3918 quando se realizaram as duas formas de microbiolização.



**Figura 3** – Índice de enraizamento (A), biomassa de raízes (B) e incidência de podridão de miniestacas (C) causada por *Cylindrocladium* spp. no clone 3487, propagado com o uso de diferentes isolados (3918, FL2 e S1) de rizobactérias aplicados no substrato (S), por imersão de miniestacas (I), e os dois tratamentos (S + I). Colunas sob a mesma letra e no mesmo isolado de rizobactéria não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Figure 3** – Rooting index (A), root biomass (B) and disease incidence caused by *Cylindrocladium* spp. (C) in substrate (S), immersion of mini-cuttings (I), and the two treatments of microbiolization (S + I) with rhizobacteria isolates. Columns under the same letter did not differ statistically by the Tukey test ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Vários mecanismos de ação têm sido sugeridos para explicar o fenômeno de promoção de crescimento mediado por rizobactérias. Entre esses mecanismos incluem o incremento na fixação de nitrogênio, produção de auxina, giberelinas, citocininas e controle do nível de etileno, solubilização de fosfatos e oxidação de enxofre, incremento na disponibilidade de nitrato, produção extracelular de antibióticos, enzimas líticas e ácido cianídrico, incremento na permeabilidade das raízes e competição por nutrientes nos sítios radiculares, bem como indução de resistência sistêmica (CHANWAY, 1997; KLOPPER, 1996). Mesmo diante de todas essas possibilidades, pesquisas sobre a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento na área florestal, quando comparada com o setor agrícola, são praticamente

incipientes. No entanto, a utilização de rizobactérias tem surgido como tecnologia promissora, sendo estudada até então como alternativa para o incremento de biomassa em diferentes essências florestais, podendo propiciar ganhos médios de 15 a 30% e, em casos especiais, até mesmo dobrar a biomassa produzida (CHANWAY, 1997). Neste estudo, além dos ganhos em biomassa de raízes, constataram-se incrementos no índice de enraizamento, o que, provavelmente, pode estar relacionado com alterações no balanço hormonal do propágulo vegetativo, induzidas pelos isolados de rizobactérias testados.

A interação entre clones de eucalipto e isolados de rizobactérias pode estar relacionada com diferenças do ambiente da rizosfera entre os clones testados, além da própria constituição genética. Segundo Buchenauer (1998), considerando que existem diferenças quanto



à quantidade e composição de exsudatos provenientes de sementes e raízes, a depender do genótipo da planta, ocorrem variações normalmente na capacidade de colonização, no tamanho e na composição da população e na atividade de microrganismos. Em um estudo de biocontrole, foi observado que um isolado (CHAO) de *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula foi capaz de produzir concentrações mais elevadas do antibiótico pioluteorina em raízes de agrião do que de pepino (MAURHOFER et al., 1994). Além disso, a eficiência do controle biológico mediado por *Bacillus cereus* Frankland & Frankland (VW 85) contra o tombamento de mudas de tomate variou em função do cultivar avaliado (SMITH et al., 1997). Todavia, pouco se conhece sobre o controle do genótipo da planta sobre a composição da população de rizobactérias no sistema radicular (OKA et al., 1997) e sobre as características das bactérias que contribuem para sua maior dispersão e colonização da superfície radicular (BUCHENAUER, 1998).

Alterações na quantidade e composição dos exsudatos radiculares de diferentes espécies de plantas, bem como de cultivares e genótipos de uma mesma espécie, têm sido relatadas como a causa de variações na indução do crescimento de plantas inoculadas com rizobactérias (SHISHIDO e CHANWAY, 1999). Neste estudo, a interação entre isolado de rizobactéria e clone de eucalipto foi significativa para enraizamento e biomassa radicular. Dessa forma, havendo o interesse em utilizar esses microrganismos benéficos em escala comercial, torna-se necessário identificar em cada material genético o isolado mais promissor. Diante das particularidades da propagação clonal do eucalipto, principalmente em relação à alta rotatividade de clones nos viveiros, idealmente faz-se necessário realizar uma seleção considerando as variabilidades entre os diferentes materiais genéticos e selecionar isolados menos específicos.

No campo agrônomo, uma das principais formas de veiculação de rizobactérias até então estudadas é via microbiolização de sementes (LUZ, 1993), sobretudo quando o objetivo é o biocontrole de patógenos no solo. Entretanto, como na maioria dos casos a propagação do eucalipto ocorre por enraizamento de estacas, não é possível utilizar essa forma de microbiolização. Portanto, os resultados evidenciaram pelo menos duas formas alternativas de aplicação dos isolados de rizobactérias.

Muitos estudos têm demonstrado que certos isolados de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, especialmente aqueles pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, proliferam não somente ao redor do sistema radicular, mas são capazes também de colonizar os tecidos internos de várias espécies de plantas (HALLMANN et al., 1997). Ainda não há informações sobre a capacidade de colonização dos isolados testados. Todavia, existindo isolados endofíticos, a sua aplicação poderá ser feita ainda na fase de produção de brotações em minijardim clonal, garantindo que as miniestacas sejam produzidas já microbiolizadas. Existem vários exemplos de rizobactérias endofíticas. Como exemplos, um isolado de *Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Mace (Pw-2R) promotor de crescimento foi recuperado do interior de raízes de *Pinus contorta* var. *latifolia* (Dougl.) Engelm. após a desinfestação superficial pelo método de diluição (SHISHIDO et al., 1995). Mais tarde, esse mesmo isolado (Pw-2R), juntamente com um de *P. fluorescens* (Sm3-RN), foi recuperado de tecidos internos da haste de mudas de abeto (*Picea glauca* x *P. engelmannii*) e visualizado usando a técnica de coloração por imunofluorescência (SHISHIDO et al., 1999). Em outro estudo, bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram capazes de atuar como agentes de biocontrole, promovendo o crescimento de plantas indiretamente, por inibir microrganismos patogênicos como *Pythium* e *Rhizoctonia* (HAGEDORN et al., 1993) ou, diretamente, por induzir resistência sistêmica contra fungos e bactérias patogênicos, como *Fusarium* e *Pseudomonas syringae* Van Hall (WEI et al., 1996).

A diagnose de miniestacas não enraizadas evidenciou incidência maior de podridão de miniestacas, causada por *Cylindrocladium* spp. na testemunha, em comparação com os tratamentos com rizobactérias, independentemente da forma de microbiolização. Embora ainda não seja conhecido o modo de ação desses isolados de rizobactérias, pelos resultados é provável presumir que a supressão de microrganismos patogênicos esteja envolvida como mecanismo indireto de promoção de crescimento. Além disso, sabe-se que a inibição de microrganismos deletérios também pode ocorrer, uma vez que, embora o efeito de microrganismos patogênicos seja facilmente detectável e conhecido, a atuação desses outros microrganismos é dificilmente constatada, já que a sua ação se restringe à produção de metabólitos tóxicos, cujo efeito se expressa na redução do desenvolvimento, em função



do efeito negativo sobre os processos de germinação, brotação e enraizamento da planta hospedeira (SCHIPPERS et al., 1987).

Indução do enraizamento adventício de explantes de *Pinus elliottii*, sob condições axênicas, produzido por um isolado não identificado de bactéria, propiciou ganhos de 15 a 90% em relação à testemunha (BURNS e SCHWARZ, 1996). No entanto, sob condições de propagação em viveiro, poucos trabalhos mostram o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento na iniciação e desenvolvimento de raízes adventícias, bem como no biocontrole. Desse modo, este trabalho comprovou, no eucalipto, a eficiência de isolados de rizobactérias na indução do enraizamento adventício, bem como no crescimento, incluindo a comprovação da especificidade de isolados de rizobactérias e clones de eucalipto. Em relação às formas de microbiolização, observou-se que os métodos testados foram eficientes e esses devem ser investigados considerando outros critérios, como facilidade de operacionalização, consumo de inoculante e custo, entre outros fatores.

A interação entre isolados de rizobactérias e clones de eucalipto pode constituir fator complicador na operacionalização do emprego de um inoculante à base de rizobactérias. Para contornar esse problema, torna-se necessário selecionar isolados com maior capacidade plástica, ou seja, aqueles que são capazes de aumentar o enraizamento e crescimento de maior número de clones possível.

Assim, para que essa tecnologia possa ser empregada em larga escala, outros estudos devem ser realizados, incluindo a possibilidade de utilizar isolados em mistura, como já foi pesquisado por Boer et al. (1999). Dessa forma, podem-se otimizar o enraizamento, crescimento e biocontrole de patógenos associados à propagação clonal do eucalipto. Além disso, é necessário desenvolver uma formulação comercial (AMER e UTKHEDE, 2000) de baixo custo, de fácil aplicação e com longa vida de prateleira (shelf life).

## 5. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.
- AMER, G.A.; UTKHEDE, R. S. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, n.9, p.809-816, 2000.
- BOER, M. et al. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, n.2, p.201-210, 1999.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.
- BURNS, J. A.; SCHWARZ, O. J. Bacterial stimulation of adventitious rooting on in vitro cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) seedling explants. **Plant Cell Reports**, v.15, n.6, p.405-408, 1996.
- CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: An emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v.43, n.1, p.99-112, 1997.
- ENEBACK, S. A.; WEI, G.; KLOEPPER, J. W. Effects of PGPR on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v.44, n.1, p.139-144, 1998.
- HAGEDORN, C., GOULD, W.D., BARDINELLI, T.R. Field evaluations of bacterial inoculants to control seedling disease pathogens on cotton. **Plant Disease**, v.77, n.3, p.278-282, 1993.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914, 1997.
- KADO, E. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v.46, n.6, p.406-409, 1996.
- LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.33-77, 1993.
- MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.843-851, 2005.

- MAURHOFER, M. et al. Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO in involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, n.3, p.221-232, 1994.
- OKA, N., HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Effect of plant genotype on rhizobacterial composition of *Arabidopsis thaliana*. In: OGOSHI, A., et al. (Eds.) Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects; INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, JAPAN-OECD JOINT WORKSHOP, 4., Sapporo, 1997. **Proceedings...** Japan, 1997. p.437-440.
- RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, n.11, p.1158-1164, 1998.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.339-358, 1987.
- SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth promoting *Pseudomonas*. **Canadian Journal of Botany**, v.77, n.1, p.22-31, 1999.
- SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.nP. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.29, n.2, p.191-196, 1999.
- SHISHIDO, M.; LOEB, B. M.; CHANWAY, C. P. Rhizosphere and internal root colonization of Lodgepole pine by two seeding growth-promoting *Bacillus* strains originating from different root microsites. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.701-713, 1995.
- SHISHIDO, M.; CHANWAY, C. P. Colonization and growth promotion of out planted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. **Canadian Journal of Forest Research**, v.30, p.845-854, 2000.
- SMITH, K. P.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Modeling dose-response relationships in biological control. Partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent. **Phytopathology**, v.87, n.7, p.720-729, 1997.
- TEIXEIRA, OD. A. et al. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.118-123, 2007.
- TEIXEIRA, D. A. et al. 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.
- TITON, M. et al. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, v.27, n.1, p.1-7, 2003.
- 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, n.2, p.221-224, 1996.