

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE *EUCALYPTUS* SPP. NAS FASES DE PROPAGAÇÃO CLONAL

Jeane de Fátima Cunha⁷

Acelino Couto Alfenas⁸

RESUMO

Doenças causadas por fungos é um desafio à cultura do *Eucalyptus* spp., podendo, inclusive, limitar o uso de clones suscetíveis. O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência de rizobactérias promotoras de crescimento sobre a porcentagem de germinação e a biomassa do sistema radicular de miniestacas de *Eucalyptus* spp.. Testaram-se os isolados de rizobactérias FL2, S1, MF2 e 3918. Aos 30 dias avaliou-se a porcentagem de enraizamento e a biomassa do sistema radicular. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, composto de cinco clones de *Eucalyptus* spp. (1209, 57, 1274, 129 e 7074) e cinco tratamentos (FL2, S1, MF2, 3918 e testemunha) com seis repetições de 176 miniestacas. Verificou-se aumento significativo na biomassa do sistema radicular para todos os clones testados. Para o clone 7074 todos os isolados de rizobactérias foram superiores à testemunha. A média de ganho de todos os isolados testados para este clone foi de 70 %. Para o clone 129 foi de 41,2 %, para o 1209, 41,4 % e para o 1274 de 42,2 %. Para o clone 57, apesar de não ter havido diferença estatística significativa, o isolado 3918 destacou-se da testemunha aumentando o enraizamento em 75,4 %. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para porcentagem de enraizamento. Os resultados obtidos mostram ganhos significativos na produção de mudas, sem nenhum ajuste no manejo ou na estrutura do viveiro. Além desse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física dos viveiros, ao se diminuir o tempo de formação das mudas, reduzindo-se o custo de produção.

Palavras-chave: rizobactérias, *Eucalyptus* spp. e clonagem.

ABSTRACT

Fungal diseases are challenges in *Eucalyptus* spp. cultivation and can even place constraints on the use of susceptible clones. The present study evaluated the effect of plant growth-promoting rhizobacteria (isolates FL2, S1, MF2 and 3918) on the percentage of germination and root system biomass in *Eucalyptus* spp. minicuttings. A completely randomized design was used, which involved five *Eucalyptus* spp. clones (1209, 57, 1274, 129 and 7074) and five treatments (FL2, S1, MF2, 3918 and control) of 176 minicuttings in six replications. After 30 days a significant increase was verified in the root system biomass of all test clones. Associated with clone 7074, all rhizobacteria isolates outmatched the control. The mean gain of all tested isolates with this clone was 70 %. In association with clone 129 it was 41.2 %; with 1209 41.4 %; and with 1274 42.2 %. With clone 57, although there was no statistically significant difference, isolate 3918 stood out over the control by increasing rooting by 75.4 %. There were no statistically significant differences among treatments regarding rooting percentage. Our results demonstrated significant gains in the plantlet production, without requiring any modification in nursery management or structure. Besides this direct gain, the utilization of the physical structure of the nurseries can be enhanced by reducing the time of plantlet formation, thus reducing the production costs.

Key-words: rhizobacteria, *Eucalyptus* spp. and cloning.

⁷ Mestre em Ciência Florestal pela Universidade Federal de Viçosa. <jeanefcunha@yahoo.com.br>

⁸ Professor do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. <aalfenas@ufv.br>

1. INTRODUÇÃO

A demanda por madeira e a competição de mercados estimula a busca de alternativas para o aumento da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* spp.. A clonagem de genótipos promissores vem possibilitando um considerável avanço na silvicultura intensiva de *Eucalyptus* spp. no Brasil (Santos, 1994), pois permite a manutenção plena das características da planta-matriz e envolve as fases de seleção e resgate de material genético, testes clonais e multiplicação comercial de matrizes superiores (Alfenas e Zauza, 2002). A clonagem de *Eucalyptus* spp. em escala comercial pode ser feita por meio de estaquia (macroestaquia), microestaquia ou miniestaquia (Alfenas e Zauza, 2002). Para o sucesso desejado na implantação do *Eucalyptus* spp. é importante que as mudas sejam bem formadas, possibilitando melhor desempenho em condições de campo. Sendo assim, técnicas alternativas que otimizem a produção do *Eucalyptus* spp. são fundamentais para melhorar a qualidade das mudas e reduzir o custo de produção. Neste aspecto as rizobactérias ganham destaque, pois podem propiciar a produção de mudas melhores.

Rizobactérias são bactérias da rizosfera com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo (Schoroth e Hancock, 1982). A interação entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (Schippers et al., 1987). Rizobactérias benéficas são encontradas na rizosfera de diversas culturas e 2 a 5% dos isolados dessas rizobactérias podem apresentar um efeito positivo no crescimento de plantas (Schroth e Hancock, 1981). Aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção do crescimento e/ou proteção contra organismos patogênicos são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et al., 1990; Luz, 1996). As rizobactérias que são prejudiciais às plantas, chamadas DRMO (Deleterious Rhizosphere Microorganisms) colonizam as raízes e são consideradas patogênicas (Suslow e Schroth, 1982).

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

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

Dentre 107 isolados de bactérias obtidas da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, dez (Ca, FL2, MF2, MF4, RC3, R1, 3918, S1, S2 e CIIB) apresentaram potencial como promotores de enraizamento (Teixeira, 2001).

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de rizobactérias promotoras de crescimento sobre o enraizamento e a matéria seca do sistema radicular de miniestacas de *Eucalyptus* spp..

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na empresa florestal CENIBRÁ S. A, localizada em Belo Oriente-MG.

O ensaio foi instalado em 04/06/02 e avaliado em 04/07/2002.

Avaliou-se a eficiência de rizobactérias sobre a rizogênese de miniestacas de *Eucalyptus*, quanto à porcentagem de enraizamento e a biomassa radicular dos clones 1209, 57, 1274, 129 e 7074. Os isolados de rizobactérias testados foram: FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), 3918 (*Bacillus subtilis*), S1 (*Bacillus subtilis*) e MF2 (*Pseudomonas* sp)

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, composto de cinco clones (1209, 57, 1274, 129 e 7074) e cinco tratamentos (FL2, S1, MF2, 3918 e testemunha) com seis repetições de 176 miniestacas.

2.1. Produção do Inóculo

Para a produção de inóculo, suspensões bacterianas em solução salina foram obtidas a partir de colônias crescidas em MB-1 por 48 horas a 27° C. As suspensões foram vertidas em tubos Falkon e conservadas em gelo para transporte. A concentração de inóculo foi ajustada para 0,2 de absorbância (540nm), o que corresponde a 10^8 ufc (unidades formadoras de colônias)/ml.

A fim de confirmar a concentração de inóculo aplicada e a viabilidade das células bacterianas, em cada ensaio reservou-se uma alíquota de cada suspensão para posterior avaliação no Laboratório de Patologia Florestal da UFV.

À suspensão de inóculo, adicionou-se 1% de leite em pó como fonte alimentar inicial das rizobactérias. A suspensão de inóculo dos respectivos isolados, equivalente a 5mL de suspensão por 50 cc (centímetros cúbicos) de substrato, foi aplicada no substrato e homogeneizada em misturador apropriado.

2.2. Rizobacterização do Substrato

A aplicação do inóculo foi feita diretamente em betoneira usada para homogeneização do substrato.

No preparo da mistura, em cada betoneira foram adicionados: 200 litros de casca de arroz carbonizada, 200 litros de vermiculita, 3,2 Kg de Superfosfato simples e 25 litros de solução estoque contendo: 10 kg de sulfato de amônio, 3 Kg de cloreto de potássio, 200 g de sulfato de zinco, 200g de sulfato de cobre, 200g de sulfato de manganês e 400g de ácido bórico, à solução estoque foi adicionado à suspensão de inóculo a 0,2 de absorbância (10^8 ufc/ml).

Após a homogeneização, a mistura foi distribuída em tubetes cônicos de 50 mL de capacidade sendo que o volume de 264 litros de cada betoneira foram suficientes para preencher 5280 tubetes, distribuídos em 30 bandejas. Após preenchimento dos tubetes, estaqueou-se cada clone separadamente entre os tratamentos. Depois de estaqueadas, as bandejas foram colocadas em casa-de-enraizamento com temperatura controlada. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de enraizamento e a matéria seca de raízes.

2.3. Avaliação da Porcentagem de Enraizamento e Matéria Seca

Para avaliação da porcentagem de enraizamento, todas as mudas enraizadas foram quantificadas por tratamento e repetição. Para avaliar a produção de biomassa de raízes, 25% das plantas de cada tratamento e repetição foram retirados dos tubetes, removendo-se inteiramente o substrato. As raízes foram lavadas, separadas da parte aérea, colocadas em sacos de papel devidamente etiquetado e levadas à estufa para secagem numa temperatura de 70°C por 24 horas. Após secagem em estufa, as raízes foram pesadas em balança de precisão e os dados foram processados no software SAEG. Utilizou-se o teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Porcentagem de Enraizamento

Apesar de não ter havido diferença estatística entre os tratamentos para porcentagem de enraizamento, alguns isolados se destacaram da testemunha, conforme o clone testado. Para os clones 1209 e 1274, o melhor isolado foi o S1, com incrementos na porcentagem de enraizamento na ordem de 11,2 e 2,5 %, respectivamente. Para os clones 129, 7074 e 57, o isolado FL2 aumentou a germinação em 3,8, 3,7 e 1,2 %, respectivamente. A melhor resposta foi obtida com a combinação do isolado S1 e o clone 1209, propiciando um ganho de 10,5 % em enraizamento. O ganho médio para este clone foi de 10,5 % (tabela 1).

Tabela 1

Porcentagem de enraizamento dos clones 1209, 1274, 129, 57 e 7074 tratados com os isolados S1, FL2, 3918 e MF2 incorporados ao substrato mediante homogeneização em betoneira.

	Enraizamento (%)				
	Clone				
	1209	1274	129	57	7074
S1	69	81	79	82	81
FL2	68	80	82	83	85
3918	62	77	79	83	85
MF2	60	75	74	79	80
Testemunha	62	79	79	82	82
CV (%)	11,73	7,07	7,07	6,7	7,3

Os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. CV= 6,7%.

Fonte: Dados da pesquisa

3.1.1.2. Matéria Seca de Raiz

Os clones 7074, 129, 1209 e 1274 responderam significativamente à rizobacterização. Para o clone 7074 todos os isolados foram superiores à testemunha. O isolado 3918 proporcionou um ganho significativo de 75,4 %, comparando-se com a testemunha. A média de ganho de todos os isolados testados para este clone foi de 70 %. Para os clones 129, 1209 e 1274, o isolado S1 propiciou um ganho significativo de 53,2, 47,4 e 52 %, respectivamente, em relação à testemunha. A média de ganho de todos os isolados testados para o clone 129 foi de 41,2 % enquanto que para o 1209 foi de 41,4 % e para o 1274 de 42,2 %. Para o clone 57, apesar de não ter havido diferença estatística significativa, o isolado 3918 destacou-se da testemunha

aumentando o enraizamento em 75,4 % (tabela 2). A melhor resposta obtida foi para a combinação do isolado 3918 e o clone 7074.

Esses resultados comprovam a eficiência dos isolados rizobacterianos testados em aumentar a biomassa de raízes e conseqüentemente o crescimento de mudas clonais, possibilitando ganhos até mesmo para clones com índices de enraizamento elevado.

Tabela 2

Matéria seca do sistema radicular dos clones 1209, 1274, 129, 57 e 7074 tratados com os isolados S1, FL2, 3918 e MF2 incorporados ao substrato mediante homogeneização em betoneira.

Matéria seca do sistema radicular (mg)					
	Clone				
	1209	1274	129	57	7074
S1	1350 A	2000 A	1583 A	2200	1833 A
FL2	1316 A	1850 AB	1516 AB	2016	1800 A
MF2	1266 A	1683 B	1483 AB	2016	1833 A
3918	1250 A	1950 A	1250 BC	2300	1900 A
Testemunha	916 B	1316 C	1033 C	2033	1083 B
CV (%)	13,12	10,90	20,55	28,29	11,32

Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan..

Fonte: Dados da pesquisa

4. DISCUSSÃO

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

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

Eucalyptus spp., observou-se um incremento de 62,8 % no enraizamento e 24 % na matéria seca do sistema radicular, quando tratadas com um isolado de *Pseudomonas* (Teixeira, 2001).

Além da vantagem de serem encontradas em grande quantidade no solo, as rizobactérias são cultivadas em meio de cultura, facilitando o uso de formulações comerciais (Weller, 1988). Fertilizantes bacterianos não simbioses (*Azobacter* e *Bacillus*) foram primeiramente empregados no final do século XIX (1885) na antiga União Soviética. No mercado norte-americano já existem seis formulações a base de PGPR's, como por exemplo, o produto Kodiak à base de *Bacillus subtilis* usado no controle de tombamento de mudas em diversas culturas (Turner e Backman, 1991; Luz, 1996), o K-84 (*Agrobacterium radiobacter*) para o controle de doença da galha (*Agrobacterium tumefaciens*) e o Dagger G (*Pseudomonas fluorescens*) utilizado para controle da podridão de raiz de algodão (*Rhizoctonia* e *Pythium*) (Kerr, 1980). As formulações dos isolados FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus subtilis*), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.) e VC2 (não identificado) estão sendo produzidas no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno do Departamento de Fitopatologia/Bioagro (UFV). Testes em escala comercial nas principais empresas produtoras de eucalipto têm comprovado a eficácia destas rizobactérias.

5. CONCLUSÕES

Apesar de não ter havido diferença estatística significativa para a porcentagem de enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus* spp., todos os isolados se destacaram quanto ao aumento de matéria seca de raízes, promovendo ganhos médios de 59,6 % na biomassa de raízes. Esses resultados comprovam a eficiência dos isolados rizobacterianos testados, pois observou-se ganho significativo na biomassa de raízes e conseqüentemente no crescimento de mudas clonais, até mesmo para clones com índices de enraizamento elevado.

O uso de PGPR's (Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) durante a fase de produção de mudas de *Eucalyptus* spp. é uma alternativa com grande probabilidade de sucesso, pois os resultados obtidos mostram ganhos significativos na produção de mudas, sem nenhum ajuste no manejo ou na estrutura do viveiro. Além desse ganho direto, pode-se ter um melhor aproveitamento da estrutura física dos viveiros, ao se diminuir o tempo de formação das mudas, reduzindo-se o custo de produção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V. Clonagem e algumas doenças de *Eucalyptus* em viveiro e campo. **Viçosa – MG. 2002. 40p.**

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

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

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

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

- DIGAT, B., EXPERT, J.M., BOSSIS, E. Ces bactéries qui protègent et stimulent les semences et les plantules. **PHM Revue Horticole**, n.341, p.16-21. 1993.
- 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.
- GARDNER, J. M.; CHANDLER, J. L.; FELDMAN, A. W. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. **Plant and Soil**, v.77, n.1, p.103-113, 1984.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology** 41: 109-117. 1995.
- KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, 64: 24-30, 1980.
- KLOEPPER, J.W., ZABLOTOWICZ, R.M., LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. Pp. 315-326. In: Keister, D.L. & Cregan, P.B. eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, **Academic Publishers**. 1990.
- LIFSHITZ, R., KLOEPPER, J.W., KOZLOWSKIM, M., SIMONSON, C., CARLSON, J., TIPPING, E.M., ZALESKA, I. Growth promotion of canola seedling by a strain of *P. Putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **RAPP**. v.4, p.1-50, 1996.
- MAIAK, S., TIROSH, T., GLICK, B.R. The influence of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 on the rooting of mung bean cuttings. In: INT. WORKSHOP ON PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 4., 1997. **Proceedings...**, Sapporo, Japan: OECD, p.313-315. 1997.
- MAHAFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Applications of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In Pankhurst, C.E.; Doube, B.M.; Gupta, V.V.S.R. & Grace, P.R. (eds.). **Soil Biota: Management in Sustainable farming systems**. CSIRO Austrália. p. 23-31. 1994.
- MOHAMMAD, G., PRASSAD, R. Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in pollipoted *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. **J. Trop. For.**, v.4, p.74-77. 1988.
- SANTOS, P. E. T. O uso da clonagem na silvicultura intensiva. **Silvicultura**, v. 15, n. 57, p. 28-29, 1994.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Ann. Rev. Microbiol.** 35: 453-476. 1981.
- SCHROTH, M.N., HANCOCK, J. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376.1982.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., VAN PEER, R. Beneficial and deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**. V.5, p.339-358. 1987.
- SUSLOW, T.V., SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacterias as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, 72: 111-115. 1982.

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

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

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