

EFEITOS DA RIZOBACTERIZAÇÃO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE ESPÉCIE NATIVA

Jeane de Fátima Cunha Brandão¹, Isac Jonatas Brandão².¹ Doutorado em Meio Ambiente pela UFV, FACIG, Jeanefcunha@yahoo.com.br² Mestrado em Economia Aplicada pela UFV, FACIG, isacbrand@yahoo.com.br

Resumo- O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de isolados de rizobactérias na germinação de sementes e no crescimento de mudas de sibipiruna. Testaram-se os isolados de rizobactérias pré-selecionados para eucalipto, sendo eles, FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus subtilis*), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.) e VC2 (não identificado). A suspensão de cada rizobactéria foi preparada no laboratório de Patologia Florestal, sendo adicionada ao substrato. Na testemunha o substrato foi tratado apenas com água. O substrato inoculado foi homogeneizado e distribuído nos tubetes montados em bandejas de 96 células devidamente etiquetadas por repetição e tratamento. Foram avaliadas a porcentagem de germinação, o peso de matéria seca de raízes e da parte aérea aos 40 dias. As médias foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de significância. Verificou-se aumento significativo na matéria seca de raízes e da parte aérea para todos os isolados de rizobactérias testados, em relação à testemunha. Para porcentagem de germinação a maioria dos isolados diferiu significativamente da testemunha. O uso de PGPR's (Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) durante a fase de produção de mudas de espécies nativas tende a ser uma alternativa com grande probabilidade de sucesso.

Palavras-chave: Sibipiruna; Rizobactérias; Matéria seca.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias

1 INTRODUÇÃO

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

Rizobactérias são bactérias da rizosfera com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo (SCHROTH; 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; 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; 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; MAHAFFEE; KLOEPPER, 1994; LUZ, 1996).

Rizobactérias tem sido estudadas há vários anos devido à capacidade de aumentar o crescimento de plantas (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; HOLL, 1993). Em *Eucalyptus camaldulensis* foi observado um incremento de

44% na sua biomassa após co-inoculação com *Azobacter chroococcum* e *Bacillus megaterium* (MOHAMMAD; PRASSAD, 1988).

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

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

2 METODOLOGIA

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

2.1 Isolados testados

Testaram-se os isolados de rizobactérias pré-selecionados para eucalipto (Teixeira, 2001), sendo eles, FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus subtilis*), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas* sp.), MF4 (*Pseudomonas* sp.) e VC2 (não identificado).

2.2 Produção e preparo do inóculo

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

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

2.3 Rizobacterização do substrato

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

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

2.4 Variáveis avaliadas

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

Para avaliação da porcentagem de germinação todas as sementes germinadas foram contadas por tratamento e repetição e para determinação do peso de matéria seca de raízes e da

parte aérea, as raízes e parte aérea de 10 plantas de cada repetição, foram destacadas, lavadas, colocadas em sacos de papel, secas em estufa a 70°C por 72 h e pesadas.

2.5 Procedimentos estatísticos

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

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se aumento significativo na matéria seca de raízes e da parte aérea para todos os isolados de rizobactérias testados, em relação à testemunha. Para porcentagem de germinação a maioria dos isolados diferiu significativamente da testemunha, a exceção do 3918 e CIIB. Apesar disso o índice de germinação para esses isolados foi numericamente maior comparando-se com a testemunha. 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; PRASSAD, 1988).

Segundo Teixeira (2001), os isolados rizobacterianos FL2 (*Pseudomonas aeruginosa*), Ca (*Pseudomonas fulva*), 3918 (*Bacillus subtilis*), R1 (*Frauteria aurantia*), S1 (*Bacillus subtilis*), S2 (*Bacillus subtilis*), CIIB (*Stenotrophomonas maltophilia*), MF2 (*Pseudomonas sp.*), MF4 (*Pseudomonas sp.*) e VC2 (não identificado) atuaram com excelentes indutores de enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp., promovendo ganhos de até 110% no enraizamento médio e 250% no peso de matéria seca de raiz.

Embora os autores Schrot e Hancock (1982), tenham relatado que isolados promotores de crescimento em uma espécie de planta podem não ser efetivo para outra, isto não foi observado para *Eucalyptus* spp. e sibipiruna. Os resultados mostram que os mesmos isolados selecionados para eucalipto por Teixeira (2001) que aumentaram a biomassa de clones de *Eucalyptus* spp., também apresentaram grande potencial para incremento de biomassa de mudas seminais de sibipiruna, isto quer dizer que os isolados de rizobactérias extraídos da região da rizosfera de mudas de *Eucalyptus* spp., não são específicos para essa espécie, podendo ser utilizados para aumento de biomassa de mudas de sibipiruna e também, apresentando potencial para realização de testes com outras espécies nativas e também agronômicas. Em trabalhos realizados por Neves *et al.* (2004), observaram-se incrementos de 67% na biomassa da parte aérea e 120% na biomassa do sistema radicular em mudas de *Hovenia dulcis* (Uva do Japão), quando tratadas com um isolado de *Pseudomonas* (MF2).

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

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).

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

Os isolados de rizobactérias podem ter agido de forma direta ou indireta no crescimento de mudas de sibipiruna. Em mecanismos indiretos as rizobactérias atuam com agentes de biocontrole, suprimindo organismos deletérios ou patogênicos às plantas, ou beneficiando organismos benéficos às mesmas. Muitas vezes o efeito negativo de um microrganismo sobre a planta ocorre de uma forma dificilmente perceptível não ocorrendo infecção ou aparecimento de sintomas típicos como os induzidos por organismos patogênicos (TEIXEIRA, 2001). Embora ainda não totalmente esclarecido, o efeito direto no crescimento de plantas provavelmente decorre da produção de fitohormônios como auxinas e giberelinas, inibição da síntese de etileno e mineralização de nutrientes (MAHAFFEE; KLOPPER, 1994).

4 CONCLUSÃO

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

5 REFERÊNCIAS

CHANWAY, C.P. 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. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, n.11, p.1084-1088. 1993.

CHANWAY, C.P. 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., KLOPPER, 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.

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

KLOPPER, 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.

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

MAHAFFEE, W.F. & KLOPPER, 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 polytoped *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. **J. Trop. For.**, v.4, p.74-77. 1988.

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

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 rhizobacteria 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.