

***Bacillus subtilis*: ENRAIZAMENTO E CRESCIMENTO DE MINIESTACAS DE EUCALIPTO EM SINOP, NORTE DE MATO GROSSO, BRASIL**

Bacillus subtilis: **ROOTING AND GROWTH OF EUCALYPTUS MINI-CUTTINGS IN THE MUNICIPALITY OF SINOP, NORTHERN OF MATO GROSSO STATE, BRAZIL**

**Livia Deice RAASCH¹; Solange Maria BONALDO²;
André Aparecido Fernandes de OLIVEIRA³**

1. Engenheira Florestal Graduada na Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Sinop, MT, Brasil; 2. Professora, Doutora, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais – ICAA - UFMT, Sinop, MT, Brasil. sbonaldo@ufmt.br; 3. Engenheiro Agrônomo, Cuiabá, MT, Brasil.

RESUMO: A crescente demanda pela implantação de florestas plantadas tem exigido diversos estudos para inovações no processo de produção e melhor aproveitamento econômico da floresta. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas vem despontando como uma alternativa viável para otimizar o desenvolvimento e produção dessas florestas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o enraizamento e crescimento de miniestacas em cinco clones de eucalipto, H13, 1004, GG100, 1277 e I144, mediado por rizobactérias, através de um inoculante biológico que possui em sua formulação como princípio ativo a rizobactéria *Bacillus subtilis*. A inoculação foi realizada de três maneiras distintas: diretamente no substrato, por imersão das miniestacas em suspensão de inóculo e pela combinação dos referidos métodos, sendo comparado com o tratamento testemunha que seguiu o padrão do viveiro. Foram avaliados, número de raízes emitidas abaixo do tubete, comprimento de raízes (cm), massa fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea (g) e altura (cm) das mudas. Os resultados variaram de acordo com o clone, parâmetros avaliados e método de inoculação. Com base nos resultados houve ganho significativo em todos os parâmetros analisados, com aumento na emissão de raízes de até 53,2%. Na biomassa do sistema radicular e da parte aérea, houve incrementos que variaram entre 45,9 e 45,1%, respectivamente. Para o crescimento das mudas observou-se aumento, variando entre 20,3 a 37,2%. Estes resultados indicam o potencial de uso da rizobactéria *Bacillus subtilis* para incrementar a produção de mudas de eucalipto em viveiro.

PALAVRAS-CHAVE: Rizobactérias. Miniestacas. Inoculação. Substrato. Incremento.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a competitividade do setor florestal é crescente e, dentro deste cenário se destaca a produção de eucalipto, principalmente devido as condições climáticas favoráveis e tecnologias desenvolvidas pelas empresas e instituições de pesquisa do país. Atualmente é a essência florestal mais plantada, destinada à produção de matéria prima vegetal para celulose, carvão, madeira para serraria, postes, mourões, óleos essenciais, construção civil, dentre outros. A produção de mudas é feita principalmente por meio da clonagem, via miniestaquia, a qual garante a manutenção plena das características da planta-matriz-elite selecionada e, a implantação de talhões uniformes de elevada produtividade, incluindo resistência a doenças (ALFENAS et al., 2004).

Algumas das vantagens dessa técnica em relação aos demais métodos de propagação vegetativa são: maior viabilidade econômica, com consequente aumento do rendimento operacional; otimização da área de jardim clonal; maior grau de juvenildade e de enraizamento e, menor exposição das estacas a doenças (HIGASHI et al., 2000). Apesar do enraizamento de estacas ter se tornado a

técnica de propagação vegetativa mais difundida, o mesmo apresenta limitações em relação ao seu uso, principalmente na formação de mudas com sistema radicular de baixa qualidade. Desse modo, a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento surge como tecnologia promissora, sobretudo, em face das possibilidades de incremento no índice de enraizamento, no crescimento e no controle biológico de doenças (MAFIA, 2004) e indução de resistência a patógenos foliares das miniestacas de eucalipto (TEIXEIRA et al., 2005).

Estudos envolvendo rizobactérias, chamadas de PGPR (“plant growth promoting rhizobacteria”), ou seja, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, que são bactérias que vivem naturalmente no sistema radicular da planta, vem apresentando resultados satisfatórios, obtendo efeito positivo no crescimento de raízes e parte aérea de mudas de eucalipto (MAFIA, 2004; MAFIA et al., 2005a; TEIXEIRA et al., 2007) e na resistência de doenças em plantas (TEIXEIRA et al., 2005), através de experimentos, principalmente na propagação clonal de eucalipto. As PGPRs incluem diferentes espécies pertencentes a diversos gêneros como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydroganophaga*, *Enterobacter*,

Serratia e *Azospillum* (BENIZRI et al., 2001). Embora, os mecanismos da ação de rizobactérias, ainda não estejam completamente esclarecidos, a promoção de crescimento pode ocorrer pela produção de fitormônios, como auxinas e giberelinas, por inibição da síntese de etileno e de mineralização de nutrientes (TEIXEIRA, 2001).

Em geral, a promoção do crescimento depende de vários mecanismos, sendo os principais efeitos de PGPR relacionados ao aumento da raiz, caule e crescimento de ramos e, conseqüentemente, aumentando o rendimento da planta, odendo também, suprimir microrganismos deletérios ou patogênicos (LUZ, 1996; DIGAT et al., 1993; MAHAFFEE; KLOEPPER, 1994) ou estimular a associação de fungos micorrízicos e *Rhizobium* sp. (MAHAFFEE; KLOEPPER, 1994).

Devido a esse sucesso, produtos se encontram disponíveis no mercado com formulações de PGPR apresentando diversos incrementos no crescimento e melhoria da qualidade do sistema radicular, o que garante maior velocidade no desenvolvimento das mudas, otimizando a utilização das estruturas do viveiro. Desse modo, uma parceria do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em cooperação com as principais empresas eucaliptocultoras nacionais e com a Bio Soja Indústria Química e Biológica, desenvolveram um produto biológico, *Rizolyptus*® (ZARPELON, 2007). Trata-se de um inoculante constituído por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas que atuam na rizosfera, região do solo que, por estar sob influência do sistema radicular das plantas, apresenta intensa atividade microbiana, tendo em sua formulação como princípio ativo a rizobactéria *Bacillus subtilis* (Cobn) (informação pessoal, GONTIJO BIO SOJA, 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da rizobactéria *Bacillus subtilis* no enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto no município de Sinop, norte de Mato

Grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

Formas de veiculação e inoculação das miniestacas dos clones com a suspensão de rizobactérias

O experimento foi instalado no viveiro de mudas Flora Sinop, localizado na Estrada Ruth, s/n, It 69, Setor Industrial, Sinop-MT. Testaram-se cinco diferentes clones de eucalipto Grancan 1277 que é um híbrido da espécie *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh) e *E. grandis* (Hill ex Maiden), H13, GG 100 Gerdhau, I144 e 1004, sendo os quatro últimos, híbridos das espécies *Eucalyptus urophylla* (Blake) e *E. grandis*.

O inoculante biológico *Rizolyptus*®, devido sua composição ser líquida, foi aplicado aos poucos, durante o preparo do substrato, veiculado na água utilizada para umedecimento, na proporção de 2 mL por 50 cm³ de substrato e homogeneizado em misturador apropriado, de acordo com o protocolo utilizado pela empresa Bio Soja. Este substrato foi composto de 50% de casca de arroz carbonizada, 50% de fibra de coco, 3 kg de *Basacote*, com camada superficial de 2 cm de vermiculita para cada tubete. O substrato padrão utilizado pela empresa, ou seja, sem a adição de inoculante foi utilizado como testemunha. Em todos os outros três tratamentos o inoculante foi aplicado de três maneiras distintas: diretamente no substrato, por imersão das miniestacas em suspensão de inóculo e pela combinação dos referidos métodos (MAFIA et al., 2009c). As miniestacas dos híbridos 1277, 1004 e I144, devido à dificuldade de enraizamento, foram tratadas na base com ácido indolbutírico (AIB) no tratamento testemunha e no tratamento com inoculação somente no substrato, conforme tratamento padrão do viveiro.

Os ensaios foram conduzidos, para cada clone, em delineamento inteiramente casualizado, de acordo com os tratamentos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tipos de inoculação para cada tratamento.

Tratamento	Tipo de inoculação
1	Tratamento testemunha (sem inoculação do substrato e miniestaca)
2	Inoculação do substrato com <i>Rizolyptus</i> ® (<i>Bacillus subtilis</i>)
3	Inoculação da miniestaca com <i>Rizolyptus</i> ® (<i>Bacillus subtilis</i>)
4	Inoculação do substrato e da miniestaca com <i>Rizolyptus</i> ® (<i>Bacillus subtilis</i>)

Após o estaqueamento, as repetições em cada bandeja foram identificadas por clone e tratamento. Cada tratamento foi dividido em bandejas diferentes sendo mantidas uma fileira de orifícios sem tubetes, dividindo cada clone do

experimento para minimizar o risco de contaminações pelas gotas de água durante a irrigação ou por escorrimento lateral de água na superfície da bandeja (ZARPELON, 2007). As bandejas com as miniestacas estaqueadas foram

levadas para casa de enraizamento com cobertura plástica translúcida, nebulização intermitente variável de 3 a 5 mL/tubete/dia e temperatura média de 30° a 32°C, por 28 dias. Durante esse período, foram feitas fertirrigações, sempre na última irrigação do dia, de solução nutritiva de aproximadamente 1 mm/tubete composta por 150 kg de MAP (fosfato monoamônio), 250 kg de nitrato de potássio, 300 kg de nitrato de cálcio, 500 kg de sulfato de magnésio, 50 kg de potássio fosfato monobásico e 5 kg de ácido bórico diluídos em 1000 litros de água.

Após o período de enraizamento, as mudas foram transferidas para aclimação a céu aberto. No terceiro dia de aclimação as mudas foram separadas, deixando uma fileira separando cada parcela com as mudas para favorecer o crescimento e diminuir a incidência de doenças. Foram feitas de 2 a 3 irrigações/dia dependendo das condições ambientais, com duração de 20 minutos cada, totalizando de 15 a 20 mL/tubete/dia, até sua retirada para últimas avaliações após 75 dias. Não foram realizadas adubações durante este período.

Efeito do Rizolyptus® (*Bacillus subtilis*) sobre o enraizamento e crescimento das mudas micropropagadas

Os parâmetros utilizados nas avaliações do experimento foram quantidade de raízes emitidas no fundo do tubete, altura da planta (cm), comprimento de raiz (cm), massa de matéria fresca de raiz e parte aérea (gramas) e massa de matéria seca de raiz e parte aérea (gramas).

Na avaliação de número de raízes, durante a permanência das mudas em casa de enraizamento, foram realizadas duas avaliações, sendo a primeira no 18° dia de estaqueamento e a segunda no 28° dia, pouco antes da retirada das mudas da casa de enraizamento e levadas a pleno sol. Para avaliar o índice de enraizamento foram quantificadas as miniestacas enraizadas e a quantidade de raízes emitidas de cada miniestaca no fundo do tubete.

O crescimento das mudas foi avaliado com uma régua milimetrada determinando a altura a partir do nível do substrato até a gema apical mais alta da planta (ESTOPA et al., 2007). As medições foram realizadas no 102° dia de estaqueamento e 75° de aclimação a céu aberto. Foram mensuradas todas as mudas de todos os clones e realizadas as médias de cada repetição por tratamento para cada clone para serem realizadas as análises estatísticas.

Em seguida, com a retirada das mudas do viveiro, avaliaram-se as variáveis: comprimento de raiz (cm), biomassa fresca da parte aérea e sistema radicular (gramas), biomassa seca parte aérea e

sistema radicular (gramas) para cada tratamento. Para obtenção dessas variáveis, as miniestacas foram retiradas dos tubetes, com a remoção dos resíduos de substrato, e a parte aérea das plantas foi cortada à altura do coleto. A medição das raízes foi realizada a partir do coleto até a extremidade da última raiz emitida.

O material vegetal, aéreo e radicular, foi pesado em uma balança de precisão (Marte, modelo: AS5500C), para obtenção da massa fresca e logo após, acondicionados em sacos de papel, dividindo-os por repetição de cada clone e tratamento para serem levado a estufa (Nova Ética, modelo: 400-5ND). A avaliação da massa seca, aérea e radicular, foi realizada com a secagem em estufa do material por 20h a 70°C, sendo pesados novamente em balança de precisão. Para todas as avaliações foram estimados a massa de cada variável em cada repetição, para serem realizadas as análises posteriores.

Os experimentos sobre interação entre as formas de inoculação do produto *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e clones de eucalipto foram montados, independentemente, em arranjo fatorial (4 isolados x 5 clones) e em delineamento inteiramente casualizado composto de três repetições, cada uma constituída de 10 miniestacas, totalizando 60 parcelas, considerando os 5 clones utilizados.

Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F, no nível de 5% de probabilidade, e, posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eficiência de *Bacillus subtilis* sobre o enraizamento e produção de biomassa fresca e seca radicular e aérea das mudas de eucalipto

Os incrementos em enraizamento e em biomassa fresca e seca, tanto da parte aérea quanto radicular, variaram de acordo com o tipo de inoculação e clone de eucalipto utilizado. Considerando o ganho em enraizamento, com quantidade das raízes emitidas no fundo do tubete, a interação entre o produto e clones de eucalipto foi significativa para os clones 1004, H13 e I144, considerando todos os tipos de inoculação com o produto ($Pr < 0,05$). Para os clones 1277 e GG100 não houve diferença significativa para o tratamento dentro dos clones testados. Em todos os clones foi observado o incremento de emissão de raízes em comparação a testemunha (Figura 1).

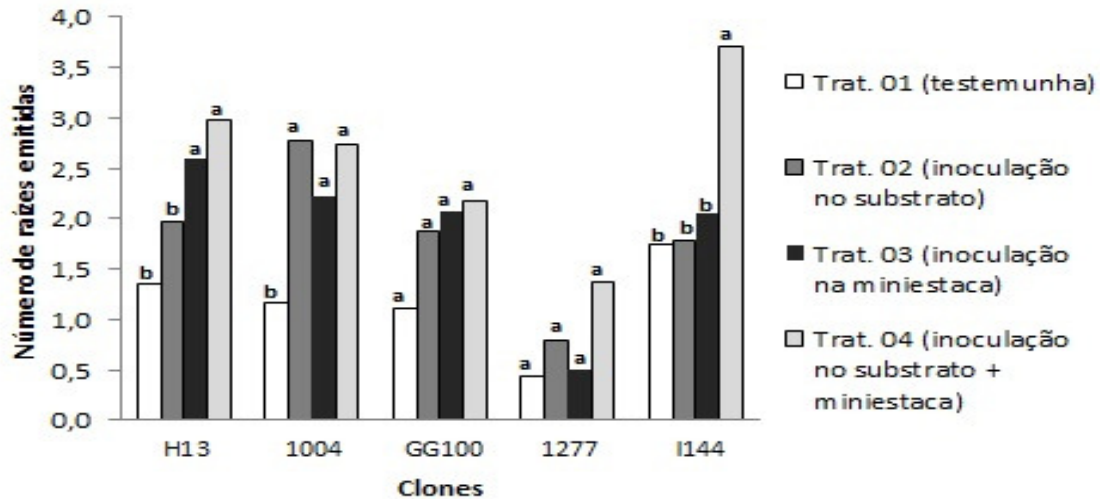


Figura 1. Índice de emissão de raízes de todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de Rizolyptus® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

Pelos dados apresentados para o clone H13, não houve diferença entre o tratamento com inoculação no substrato (T2) do tratamento testemunha, utilizado como padrão do viveiro. Os tratamentos com inoculação na miniestaca (T3) e, inoculação na miniestaca e no substrato (T4), apresentaram diferença significativa da testemunha, com aumento de duas raízes em média para cada miniestaca, dobrando a quantidade de raízes emitidas através da inoculação na miniestaca e substrato.

Para o clone 1004, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha. Os tratamentos com inoculação no substrato e inoculação na miniestaca e no substrato obtiveram maior incremento de emissão de raízes (Figura 1).

No clone I144, apenas a inoculação na miniestaca e no substrato diferenciou-se estatisticamente da testemunha, com incremento de 53,2% de emissão de raízes. Nos demais clones, GG100 e 1277 não houve diferença significativa estatisticamente para com a testemunha.

Além do aumento na emissão de raízes, não foi observado nenhum efeito negativo do produto Rizolyptus® (*Bacillus subtilis*) nas miniestacas, sobre o sistema radicular ou crescimento das mudas.

Segundo Freitas et al. (2005), mudas robustas que apresentam maior porcentual de emissão de raízes são mais aptas a condições de estresse ambiental, garantindo maiores taxas de sobrevivência no campo. Para a inoculação utilizando rizobactérias, os resultados obtidos neste

trabalho foram semelhantes aos observados por Mafia et al. (2009a), que testaram diversos isolados de rizobactérias, incluindo três isolados de *Bacillus subtilis* (S1, S2 e 3918), em quatro clones de eucalipto, obtendo em dois clones, 10 e 2277, aumento na promoção de incremento no índice de enraizamento em comparação com a testemunha, sendo que, de forma geral, nos clones 1172 e 9882, o isolado 3918, foi o mais efetivo.

Segundo Zarpelon (2007) as miniestacas em substrato rizobacterizado apresentam maior capacidade de emissão de raízes e podem ser retiradas mais precocemente da casa de enraizamento, otimizando a utilização da estrutura por período de até seis dias.

Em relação ao comprimento das raízes houve diferença significativa para dois clones testados, 1004 e I144, considerando todos os tipos de inoculações com o produto. Para os clones H13, GG100 e 1277 não houve diferença entre os tratamentos com inoculação e o tratamento padrão utilizado pelo viveiro (Figura 2).

Nos dados do clone 1004, somente os tratamentos com inoculação na miniestaca e inoculação na miniestaca e no substrato obtiveram ganhos de crescimento que diferem da testemunha, com aumento no comprimento de raízes.

Na inoculação no substrato do clone I144, houve menor comprimento (5,9 cm em média) diferindo dos demais tratamentos, incluindo o tratamento que foi utilizado como comparador, ou seja, tratamento padrão utilizado pelo viveiro.

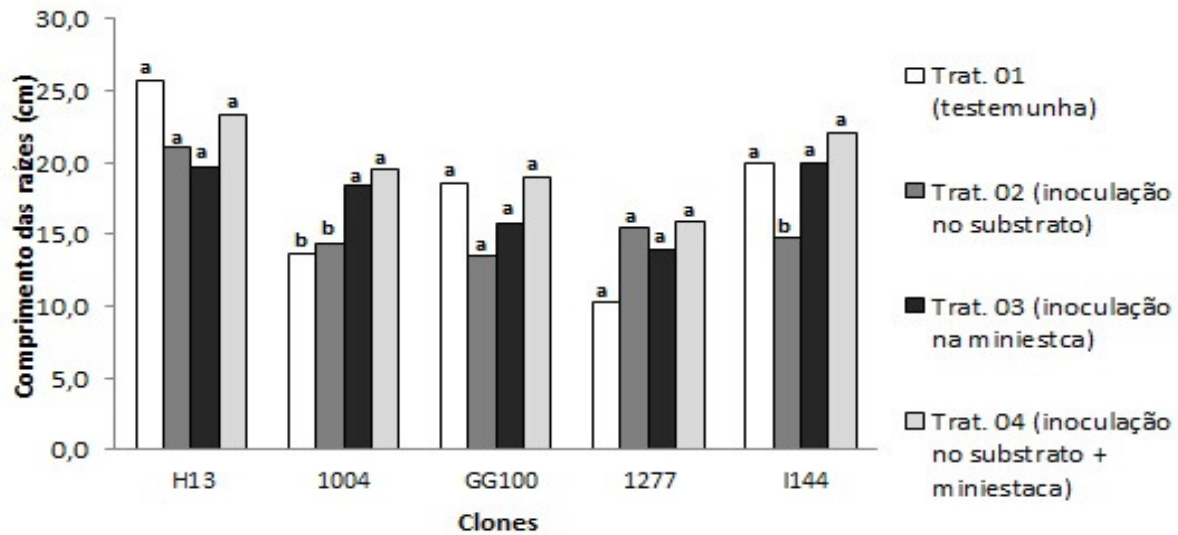


Figura 2. Índice de comprimento das raízes (cm) para todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

Embora a maioria dos clones não tenha apresentado diferença significativa para esta variável, observou-se visualmente, que todos os clones apresentaram maior desenvolvimento e melhor qualidade no sistema radicular nos tratamentos com inoculação, ou seja, apesar da redução de tamanho das raízes, as raízes principais apresentaram maior diâmetro, maior formação de raízes laterais de segunda ordem e maior uniformidade no enraizamento.

A presença de raízes principais com maior diâmetro é importante para o desempenho inicial dessas mudas no campo, propiciando maior direcionamento e maior capacidade dessas raízes em absorver água e nutrientes. Além disso, a maior emissão de raízes laterais observadas neste trabalho, de acordo com Laclau et al. (2001), favorece a alta capacidade de absorção de cálcio pelas raízes, tanto do solo quanto da serapilheira, necessária para a sustentabilidade das árvores adultas, quando pesquisaram povoamentos de *Eucalyptus* spp. com alta densidade de raízes finas, além de aumentar o contato da água com a serapilheira, aumentando também a habilidade do povoamento em absorver

dos menos favoráveis após o plantio, diminuindo a mortalidade das plantas e favorecendo seu crescimento e desenvolvimento.

Segundo Mafia et al., (2007) a maior formação de raízes adventícias e melhor qualidade no sistema radicular de mudas produzidas com rizobactérias proporcionam maior índice de

água e nutrientes sobre a superfície, por ocasião de chuvas curtas durante a estação seca.

A maior formação de raízes laterais observadas visualmente neste trabalho, podem ser assemelhadas aos resultados de Burns e Schwarz (1996), que observaram estímulo no enraizamento adventício em explantes de *Pinus elliottii* (Engelm) *in vitro*, produzido por um isolado não identificado de bactéria, propiciando ganhos de 15 a 90% em relação à testemunha.

As mudas sem inoculação de rizobactérias apresentaram maior enovelamento do sistema radicular, o que pode trazer como consequência uma redução da área foliar com baixo vigor vegetativo e consequente predisposição a doenças (ALFENAS et al., 2004). Sem o enovelamento das raízes, as mudas transplantadas para o campo retomam o desenvolvimento com maior rapidez. Além disso, com a inserção das mudas a campo, uma melhor qualidade no sistema radicular favorece a absorção de nutrientes no solo e aumento na disponibilidade de água para a planta, através da maior absorção pelas raízes, tornando as mudas menos vulneráveis a matocompetição e mudanças de temperatura e umidade que podem ocorrer em período de sobrevivência e favorece o estabelecimento mais precoce no campo após o plantio, porém há poucos trabalhos mostrando o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento na iniciação e desenvolvimento de raízes adventícias em estacas de espécies florestais.

Biomassa fresca e seca do sistema radicular

Em relação a biomassa fresca e seca radicular, as respostas foram variáveis para tratamentos e clones utilizados. Na biomassa fresca

houve diferença significativa para os clones 1277 e I144 (Figura 3). Nos demais clones não ocorreram diferenciação entre os tratamentos de rizobactérias e o tratamento padrão do viveiro.

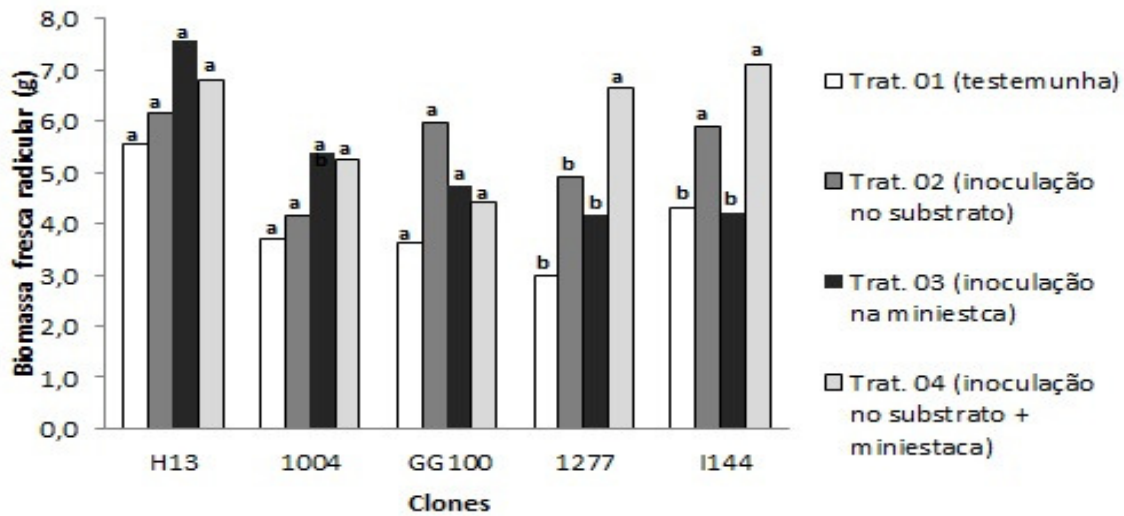


Figura 3. Índice de biomassa fresca de raízes (gramas) de todos os clones propagados em diferentes tipos de inoculação de *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

No clone 1277, apenas o tratamento com inoculação na miniestaca e no substrato apresentou diferença significativa em relação à testemunha, as outras inoculações testadas não diferenciaram-se estatisticamente.

Para o clone I144, houve diferença para os tratamentos com inoculação no substrato e

inoculação na miniestaca e no substrato comparando com a testemunha.

Na biomassa seca radicular (Figura 4) houve diferença significativa nos clones GG100 e 1277. O clone GG100 obteve diferença, em relação à testemunha, no tratamento com inoculação no substrato com aumento de 45,9% na biomassa seca das raízes.

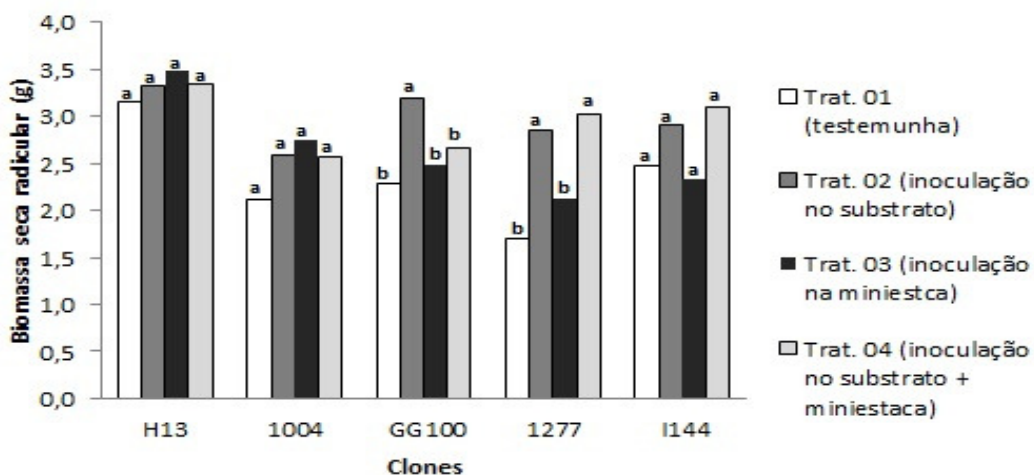


Figura 4. Índice de biomassa seca de raízes (gramas) de todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

As mudas do clone 1277 apresentaram diferenças significativas nos tratamentos com inoculação no substrato e inoculação na miniestaca e substrato, com relação ao tratamento controle, com aumento de 40,3% e 43,5%, respectivamente, na biomassa seca das raízes. Um fato a ser considerado é que este híbrido, no tratamento padrão do viveiro, utiliza em sua base, para promoção do enraizamento, o hormônio ácido indolbutírico (AIB) e, para o tratamento que obteve maior incremento na massa seca do sistema radicular, não houve a utilização desse hormônio.

Esses resultados se assemelham aos resultados obtidos por Mafia et al. (2007), uma vez que, os melhores tratamentos foram com a microbiolização do substrato com isolados de rizobactérias obtendo um aumento para biomassa radicular em termos percentuais de 10 a 239%.

Esses resultados se assemelham ao estudo desenvolvido por Mafia et al. (2007) que, ao testarem vários isolados de rizobactérias, com diferentes clones de eucalipto, no caso da biomassa

radicular, observaram que todos os tratamentos diferiram da testemunha, com incremento máximo de 162%, em termos percentuais, no tratamento com o isolado S2 (*Bacillus subtilis*).

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que há diferença na interação entre o produto e o clone, o que explica as diferenças de resposta ao processo de tratamento. Segundo Mafia (2004) também se deve considerar as diferenças no substrato de enraizamento, uma vez que fatores abióticos (pH, disponibilidade de nutrientes, retenção de umidade, aeração etc.) e bióticos (composição quali-quantitativa da microbiota e outros) poderá favorecer ou não a colonização, sobrevivência e atividade benéfica das rizobactérias.

Biomassa fresca e seca da parte aérea

Na biomassa fresca da parte aérea (Figura 5), observa-se que os clones, 1004, 1277, GG100 e I144, diferiram estatisticamente do tratamento padrão utilizado pelo viveiro ($Pr < 0,05$).

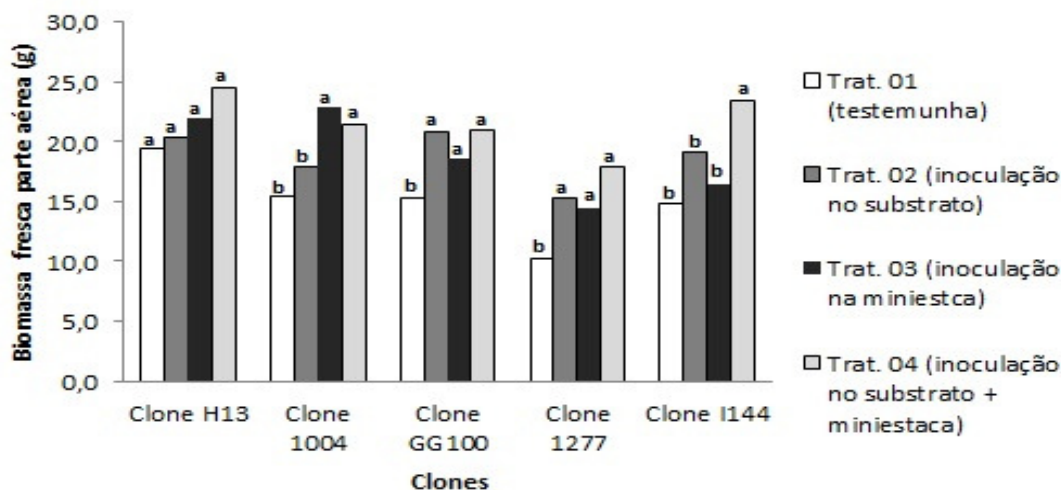


Figura 5. Índice de biomassa fresca da parte aérea da planta (gramas) de todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

O maior incremento foi observado para o clone 1277 que obteve, para a inoculação no substrato e com inoculação na miniestaca e no substrato, um percentual de 33,2 a 43,9%, respectivamente, comparados à testemunha.

Quando se comparam as respostas das mudas do clone I144, observa-se um aumento de 36,3%, em relação ao tratamento padrão do viveiro, com a inoculação da miniestaca e do substrato. As outras inoculações não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha.

Com relação ao clone 1004, não houve diferença entre o tratamento com inoculação no substrato e o tratamento padrão do viveiro. Nos demais tratamentos, houve incrementos significativos, com aumento de 27,7 e 32,4%, para inoculação na miniestaca e substrato e com a inoculação na miniestaca, respectivamente.

O aumento da biomassa fresca aérea das mudas também pode ser observado no clone GG100, pois todos os tratamentos com inoculação do produto diferenciaram significativamente das

mudas que foram utilizadas como testemunha, com incremento de 17,4 a 27% na biomassa.

Resultados semelhantes foram apresentados por Gomes et al. (2003), que relataram um aumento de 43% da biomassa fresca em mudas de alface, quando foram utilizados isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berlinier). Além disso, Liu et al. (1995) e Wei et al. (1996), empregaram para inoculação de espécies de *Pinus*, isolados selecionados capazes de induzir resistência sistêmica na cultura de pepino e tomate, observando efeito significativo na velocidade de germinação das sementes, na biomassa da parte aérea e no número de ramos por planta de *Pinus taeda* L. e peso e altura da parte aérea de *Pinus ellioti*, dependendo do isolado.

Os resultados dos testes de utilização do produto Rizolyptus® (*Bacillus subtilis*), quanto à biomassa seca da parte aérea obtiveram diferença significativa para os clones 1004 e 1277 ($Pr < 0,05$). Quando se comparam os valores obtidos,

verifica-se que, para os dois clones, somente no tratamento com inoculação na miniestaca do clone 1277 não houve diferença significativa em relação ao tratamento padrão das mudas no viveiro.

A inoculação no substrato demonstrou ser mais eficiente no clone 1277, diferenciando-se do tratamento padrão e inoculação na miniestaca, com aumento de 39,7 a 45,1% no tratamento com inoculação no substrato e do tratamento inoculação no substrato e na miniestaca, respectivamente.

Contudo, avaliando-se o clone 1004, os resultados indicam que houve diferença para todos os tratamentos com inoculação e, que para este híbrido a melhor interação, ou seja, que promoveu maior incremento na biomassa foi o tratamento com inoculação somente na miniestaca, obtendo 30,1% de aumento, como pode ser visto na Figura 6. Para a inoculação no substrato e, no tratamento com inoculação da miniestaca e substrato houve incremento de 18,8 e 23,3%, respectivamente.

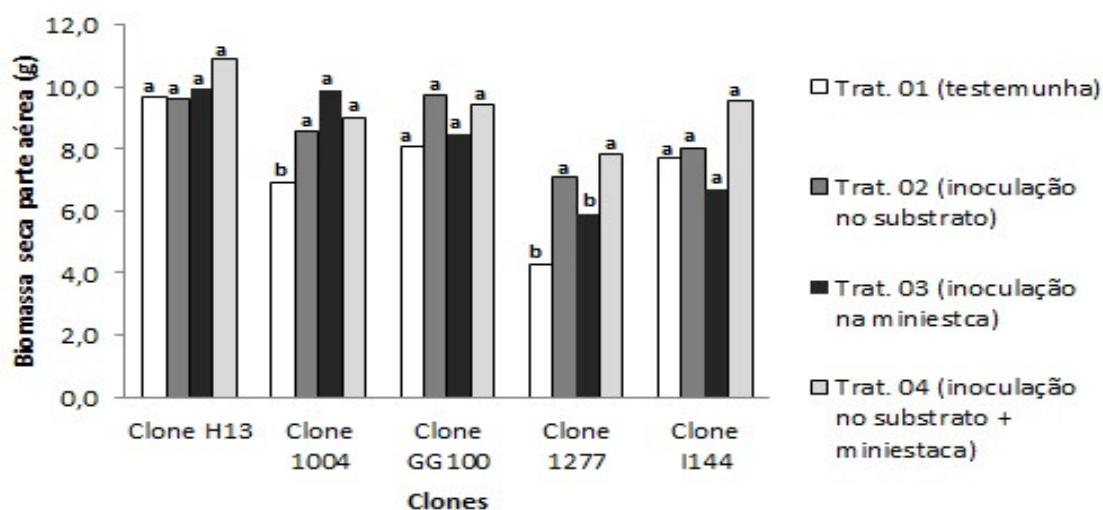


Figura 6. Índice de biomassa seca da parte aérea da planta (gramas) de todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de Rizolyptus® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser considerados promissores, uma vez que se assemelham aos encontrados por Zarpelon (2007) que, no uso de diversos isolados de rizobactérias, em clones de eucalipto, obteve com o isolado S2 de *Bacillus subtilis*, um ganho de 18% comparados ao tratamento testemunha.

Outros estudos, utilizando diversos isolados de rizobactérias, também observaram esta mesma tendência. Brunetta et al. (2007), que estudaram a interação entre isolados de rizobactérias e espécies de *Pinus*, observaram, em um isolado analisado,

aumento no peso de matéria seca da parte aérea em *Pinus ellioti*. Os mesmos autores em outro experimento, ao promover o isolamento e seleção de rizobactérias do gênero *Bacillus* spp. em *Pinus taeda*, obtiveram a indução ao incremento do peso de matéria seca da parte aérea, em quatro dos 26 isolados utilizados no ensaio (BRUNETTA et al., 2010).

Crescimento das mudas

As respostas à aplicação do produto para o crescimento de mudas variaram de acordo com o

clone de eucalipto e o método de inoculação testado. De acordo com a Figura 7, quando se comparam os valores obtidos de todos os tratamentos, a inoculação promoveu significativamente o crescimento em dois clones testados. Assim, os clones 1277 e I144, quando propagados através da inoculação do produto *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*), apresentaram melhores resultados em relação à testemunha.

Considerando os ganhos em altura, observou-se que o clone 1277, apresentou melhor

resultado com dois tratamentos destacando da testemunha. A inoculação com o produto apenas no substrato obteve um aumento de 34,6% e no tratamento com inoculação na miniestaca e no substrato, houve aumento de 37,2% na altura das mudas.

Quanto ao clone I144, somente o tratamento com inoculação na miniestaca e no substrato diferiu significativamente da testemunha, obtendo ganho de 20,3% na altura das mudas.

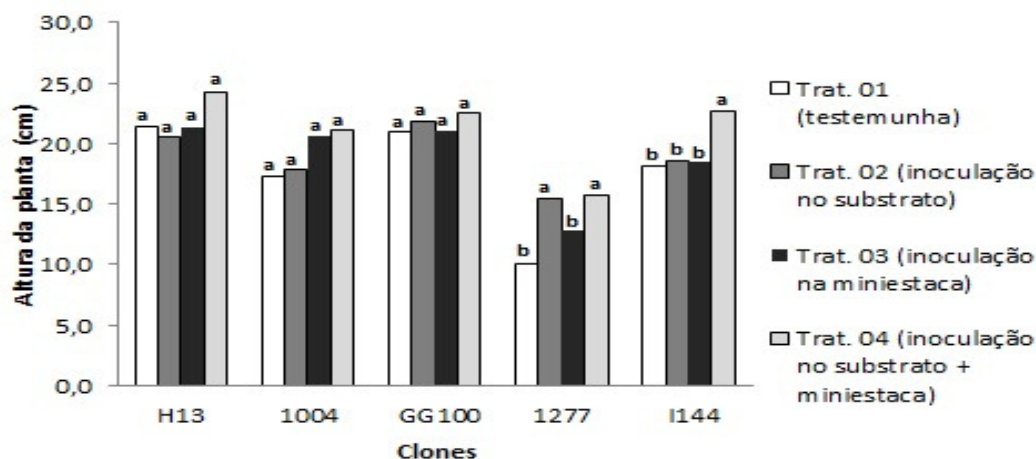


Figura 7. Índice de altura das mudas (cm) de todos os clones, propagados em diferentes tipos de inoculação de *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) e não tratados (testemunha). Colunas sob a mesma letra não diferem estatisticamente, em cada tratamento, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para cada clone.

De maneira semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Chanway (1997), tratando plântulas de pinheiro com isolados de PW2 de *Bacillus polymyxa* (Greer) e SM3-RN de *Pseudomonas chlororaphis* (GUIGNARD; SAUVAGEAU), relatou aumentos na altura e no comprimento de raízes das plântulas inoculadas com estes isolados variando entre 23 e 132%.

A capacidade de estimular o crescimento em mudas, apresentada pelas rizobactérias, tem sido confirmada pelas colocações descritas por Enebak (2005) que, inoculando isolados obtidos de *Pinus taeda* em *P. taeda*, *P. elliottii* e *Pinus palustris* (Mill), constatou que a altura da parte aérea das mudas foi incrementada por cinco de oito isolados testados em mudas de *P. taeda* e em três nas mudas de *P. elliottii*. Brunetta et al. (2010) avaliando 15 isolados de rizobactérias em *Pinus taeda* observaram que quatro deles estimularam significativamente o crescimento em altura da parte aérea das mudas.

Porém, 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. Gomes et al. (2002), trabalhando com mudas de *E. grandis*, avaliam que, a adoção da altura e peso da matéria da parte aérea devem ser consideradas, em razão desses parâmetros apresentarem boa contribuição para se determinar o padrão de qualidade das mudas.

CONCLUSÕES

As respostas na produção de mudas de eucalipto com a inoculação do produto *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*), variaram de acordo com o clone, parâmetros avaliados e método de inoculação das mudas, sendo que a utilização do produto promoveu maior índice de emissão de raízes, propiciando melhoria na qualidade no sistema radicular e incremento no crescimento das mudas, com melhor

desenvolvimento, tanto do sistema radicular quanto da parte aérea.

Os resultados obtidos indicam a importância da utilização do produto *Rizolyptus*® (*Bacillus subtilis*) nas miniestacas de eucalipto, pois, além de otimizar a produção do viveiro, aumenta a qualidade das mudas e diminui a mortalidade, produzindo mudas em melhores condições para irem a campo.

AGRADECIMENTOS

À empresa Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas pelo apoio e fornecimento do produto à pesquisa. Ao viveiro Flora Sinop, especialmente ao Srs. Jaldes e Erivan, pelo apoio, fornecimento de espaço, mão-de-obra e materiais e, colaboração durante todo o período da pesquisa.

ABSTRACT: The increasing demand for planted forests has required several studies about innovations in the production process and better economic use of the forest. The use of growth promoting rhizobacteria in plants is emerging as a viable alternative, to optimize the development and production of these forests. This study evaluated rooting and growth of mini-cuttings in five clones of eucalyptus, H13, 1004, GG100, 1277 and I144, mediated by rhizobacteria of the biological inoculant that has in its formulation as the active ingredient *Bacillus subtilis* rhizobacterium. Inoculation was done in three ways: directly on the substrate, by immersion of mini-cuttings in inoculum suspension and the combination of these methods, in comparison with standard nursery treatment. The parameters evaluated were number of roots below the container, root length (cm), fresh and dry weight of the root system and aboveground part (g) and height (cm) of the seedlings. The results varied according to the clone, the evaluated parameters and method of inoculation. Based on the results, there was significant gain in all parameters analyzed, with an increase in the emission of roots up to 53.2%. Biomass in the root system and aboveground part increased ranging between 45.9 and 45.1%. Seedling height showed an increase ranging from 20.3 to 37.2%. These results indicate the great potential of using *Bacillus subtilis* to increase the production of eucalyptus seedlings in nurseries.

KEYWORDS: Rhizobacteria. Mini-cuttings. Inoculation. Substratum. Increment.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Ed. UFV, 2004. 442 p.

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

BRUNETTA, J. M. F. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; GOMES, M.; BINOTI, D. B.; FONSECA, E. P. Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de diferentes espécies de *Pinus* sp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1027-1033, 2007.

BRUNETTA, J. M. F. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; GOMES, J. M.; BINOTI, D. B.; FONSECA, N. A. N. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 399-406, 2010.

BURNS, J. A.; SCHWARS, O. J. Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine seedling explants. **Plant Cell Reports**, Knoxville, v. 15, p. 405-408, 1996.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF; 1995, 451 p.

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

DIGAT, B.; EXPERT, J.M.; BOSSIS, E. Cesbactéries qui protègent et stimulent les semences et les plantules. **PHM Revue Horticole**, Montpellier, v. 341, p. 16-21, 1993.

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

ESTOPA, R. A.; RAMALHO, M. A. P.; REZENDE, G. D. S. P.; ABAD, J. I. M.; GONÇALVES, F. M. A. Desempenho dos descendentes de clones de *Eucalyptus* spp. auto fecundados e cruzados. **Revista Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 264-270, 2007.

FREITAS, T. A. S.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; PENCHEL, R. M.; LAMÔNICA, K. R.; FERREIRA, D. A. Desempenho radicular de mudas de eucalipto produzidas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, p. 853-861, 2005.

GOMES, J. M.; COUTO, L.; LEITE, H. G.; XAVIER, A.; GARCIA, S. L. R. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 655-664, 2002.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 699-703, 2003.

HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N. **Uso de ácido indolbutírico no enraizamento de eucaliptos**. Piracicaba: Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, 2000. 14 p. (Circular Técnica, nº 192, IPEF).

LACLAU, J. P.; ARNAUD, M.; BOUILLET, J. P.; RANGER, J. Spatial distribution of *Eucalyptus* roots in a deep sandy soil in the Congo: relationships with the ability of the stand to take up water and nutrients. **Tree Physiology**, Victoria, v. 21, p. 129-136, 2001.

LIU, L.; KLOPPER, 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**, Auburn, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 1-50, 1996.

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, 2004.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, G. M. V.; MOUNTEER, A.H. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009a.

MAFIA, R. G., ALFENAS, A. C., MAFFIA, L. A., FERREIRA, E. M., BINOTI, D. H. B., SIQUEIRA, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 789-797, 2009c.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; TEIXEIRA, D. A.; ZAUZA, E. A. V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005a.

MAHAFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Application of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P. R. (Ed.). **Soil biota: management in sustainable farming systems**. Victoria: CSIRO, 1994. p. 23-31.

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

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

TEIXEIRA, D. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; FERREIRA, E. M.; SIQUEIRA, L.; MAFFIA, L. A.; MOUNTEER, A. H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 118-123, 2007.

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

ZARPELON, T. G. **Caracterização de Rizobactérias e Eficiência do *Rizolyptus*® no Enraizamento e Crescimento de Eucalipto.** 2007. 69 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. 2007.