

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS E
FILOPLANO PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
DE MUDAS DE *Eucalyptus benthamii***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA LÍDIA MOURA DO CARMO

IRATI – PR

2012

ANA LÍDIA MOURA DO CARMO

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS E FILOPLANO PARA
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Eucalyptus benthamii***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr.: Flávio Augusto de Oliveira Garcia
Orientador

Prof^a. Dr^a.: Fabiana Schmidt Bandeira Peres
Coorientadora

Prof^a. Dr^a.: Andrea Nogueira Dias
Coorientadora

IRATI – PR

2012

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

C287p CARMO, Ana Lúcia Moura do.
Prospecção de isolados de rizobactérias e filoplano para promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* / Ana Lúcia Moura do Carmo. – Irati, PR : UNICENTRO, 2012.

36f.
ISBN

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Centro - Oeste, PR. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Schmidt Bandeira Peres
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Nogueira Dias

1. Engenharia Florestal – dissertação. 2. Eucalipto. I. Garcia, Flávio Augusto de Oliveira. II. Peres, Fabiana Schmidt Bandeira. III. Dias, Andrea Nogueira. IV. Título.

CDD 20^a ed. 583.42



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

PARECER

Defesa Nº 47

A Banca Examinadora instituída pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Florestais, do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Campus de Irati, após arguir a mestrand **Ana Lídia Moura do Carmo** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado “Prospecção de isolados de rizobactérias e filoplano na promoção de crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*”, é de parecer favorável à APROVAÇÃO da estudante, habilitando-a ao título de **Mestre em Ciências Florestais**, Área de Concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais.

Irati-PR, 17 de dezembro de 2012.


Dr. Ricardo Magela de Souza
Universidade Federal de Lavras
Primeiro Examinador


Dr. Alvaro Figueredo dos Santos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Segundo Examinador


Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR
Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR
Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

A Deus, o único que é digno de toda honra, toda glória e todo louvor, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu abrigo e meu refúgio, que me abriu as portas e me proporcionou chegar até aqui.

A Universidade Estadual do Centro-oeste (UNICENTRO).

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, pela oportunidade de aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa.

As empresas Klabin S.A. e Golden Tree Reflorestadora LTDA, pela concessão das sementes utilizadas nesse trabalho.

Aos meus pais Adelmo e Heliane, por me darem todo o apoio e carinho, e sempre me dando forças para continuar nessa caminhada. Aos meus irmãos Mariana, Raquel, João Lucas e Isabel por sempre estarem ao meu lado.

Aos professores Ricardo Magela, Álvaro Figueredo dos Santos e Eduardo da Silva Lopes por aceitarem o convite de serem membros da banca examinadora, meu muito obrigada.

Ao professor Flávio Augusto de Oliveira Garcia, a quem muito aprecio e que considero um amigo, agradeço por ter acreditado no meu potencial, pela paciência e prazer em ensinar e pela confiança em mim depositada por ser sua primeira orientada.

A professora Andrea Nogueira Dias pela co-orientação e em especial a professora Fabiana S. B. Peres pela amizade construída.

Aos meus amigos do mestrado pela amizade, em especial a Bárbara, Caciane e Gisele por me acompanharem nessa caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Proteção Florestal, Raíssa, Giovanna, Fabio e Mauro.

Ao Jairo, pela paciência e sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 <i>Eucalyptus</i> spp.....	4
3.2 <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cambage	5
3.3. Produção de mudas florestais.....	7
3.4 PGPRs.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Espécie modelo para a realização dos ensaios.....	11
4.2 Descrição do local de realização dos ensaios	11
4.3. Inóculo	11
4.4 Isolamento das bactérias	11
4.5 Ensaio de Colonização Radicular.....	12
4.6 Ensaio de Seleção Massal.....	13
4.7 Ensaio de confirmação.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1. Isolamento de Rizobactérias	14
5.2. Ensaio de Colonização Radicular.....	15
5.3 Ensaio de Seleção Massal	21
5.4. Ensaio de Confirmação	27
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Evidenciação da colonização radicular por meio de zona turbida leitosa, circundante aos pelos radiculares. A e B: sistema radicular de mudas de *E. benthamii* colonizados por propágulos de rizobactérias (setas vermelhas). C: zona de crescimento radicular de muda de *E. benthamii* do tratamento controle (água), com ausência de zona turbida leitosa (seta amarela)..... 17
- Figura 02** - Evidenciação da colonização superficial de semente de *E. benthamii* por meio de zona túrbida leitosa circundante a semente (seta vermelha). B: Semente de *E. benthamii* com ausência de zona túrbida leitosa (seta amarela)..... 18
- Figura 03** - Efeito de diferentes propágulos de rizobactérias sobre a relação diâmetro do coleto/ altura (D/H). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott–Knott, a 95% de probabilidade de significância. (UBK: Unicentro-*benthamii*-Katia; UBP: Unicentro-*benthamii*-Pinus)..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Isolados de rizobactérias obtidos a partir de solo rizosférico de <i>E. benthamii</i> e <i>Pinus</i> sp. e os respectivos códigos utilizados.....	15
Tabela 02 - Isolados de rizobactérias de <i>E. benthamii</i> com capacidade de colonização radicular em ensaio <i>in vitro</i>	16
Tabela 03 - Isolados de rizobactérias de <i>Pinus</i> sp. com capacidade de colonização radicular em ensaio <i>in vitro</i>	16
Tabela 04 Isolados de Bactérias Residentes do Filoplano de <i>E. benthamii</i> com capacidade de colonização radicular em ensaio <i>in vitro</i>	16
Tabela 05 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Eucalyptus benthamii</i> previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 1.....	19
Tabela 06 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Eucalyptus benthamii</i> previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 2.....	20
Tabela 07 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Eucalyptus benthamii</i> previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 3.....	21
Tabela 08 - Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 1 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).....	23
Tabela 09 - Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 2 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).....	24
Tabela 10 - Germinação <i>in vivo</i> de sementes de <i>Eucalyptus benthamii</i> previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 2.....	24
Tabela 11 - Relação entre diâmetro do coleto/altura (D/H) de mudas de <i>E. benthamii</i> , pré-microbiolizadas quando sementes, por propágulos de bactérias, medidas aos 120 dias após semeadura.....	25

Tabela 12 - Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 3 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).....	26
Tabela 13 - Germinação <i>in vivo</i> de sementes de <i>Eucalyptus benthamii</i> previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 3.....	26
Tabela 14 - Efeito do isolado UBK 12, no ensaio de confirmação, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).....	28

RESUMO

Ana Lídia Moura do Carmo. Prospecção de isolados de rizobactérias e filoplano para promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias de *Eucalyptus benthamii* e de *Pinus* sp., bem como de bactérias residentes do filoplano, na germinação de sementes e na promoção de crescimento de mudas de *E. benthamii* em condições *in vitro* e *in vivo*, a partir de sementes microbiolizadas com suspensões de propágulos. Para tanto, isolou-se as rizobactérias de *E. benthamii* e *Pinus* sp. por meio da técnica de diluição seriada fator 10 e utilizou-se oito isolados de bactérias residentes de filoplano pertencentes à coleção do laboratório de proteção florestal da UNICENTRO. Em condições *in vitro* avaliou-se a germinação de sementes de *E. benthamii* e a colonização radicular de mudas em que 80% dos isolados avaliados foram capazes de colonizar o sistema radicular de mudas de *E. benthamii*. Aos 120 dias após a semeadura, em condições *in vivo*, avaliou-se a germinação de sementes, o diâmetro do coleto, altura das mudas, comprimento de raiz, relação entre peso seco da massa aérea, peso seco da massa radicular e peso seco da massa total. Também foram calculados Índice de Qualidade de Dickson (IQD), relação diâmetro de coleto/altura (Dc/H) e altura/diâmetro de coleto (H/Dc). Nenhum isolado diferiu estatisticamente do tratamento controle, que foi constituído por sementes de *E. benthamii* submersas em água, em relação aos parâmetros avaliados. Não foi possível selecionar nenhum isolado com potencial de promotor de crescimento de mudas de *E. benthamii*.

ABSTRACT

Ana Lúcia Moura do Carmo. Prospecting of Rhizobacteria Isolates and Phylloplane for Promoting Growth of Seedlings of *Eucalyptus benthamii*.

The aim of this paper were measure the effect of rhizobacteria from *Eucalyptus benthamii* and *Pinus* sp., and epiphytic bacteria isolated of *E. benthamii*, in seeds germination of *E. benthamii* *in vitro* and *in vivo* assays, when seeds of *E. benthamii* were treated with bacteria propagules. The isolation of rhizobacterias was performed by using serial dilution factor 10, and the epiphytic bacteria's belong to the Forest Protection Laboratory collection of UNICENTRO. *In vitro* conditions were evaluated the germination of *E. benthamii* and root colonization of seedlings in which 80% of the bacteria isolates were able to colonize the roots of seedlings of *E. benthamii*. 120 days after seeds planting, *in vivo* conditions, were evaluated the emergence of seedlings, collar diameter, seedlings high, root tall, dry weight of phylloplane and root. Were also calculated Dickson Quality Indice, relationship of diameter/high and high/diameter. No isolate differed of the control treatment in any of the parameters avaluated. The control was constituted of seeds immersed in water for 12 hours. was efficient to growth promoting in the seedlings. None isolate was selected with potential to growth promoting to *E. benthamii* seedlings.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com vocação florestal, enfatizando-se as florestas plantadas. A obtenção de indivíduos arbóreos quantitativa e qualitativamente aceitáveis depende, dentre outros fatores, de cuidados que englobam desde a semente até a colheita do produto final.

A intervenção humana de maneira predatória sobre as florestas naturais e a crescente demanda por produtos de origem madeireira levaram à necessidade da implantação de plantios florestais. As principais espécies utilizadas em plantios florestais no Brasil são as dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* que abastecem as indústrias de papel e celulose, painéis, móveis, siderurgias a carvão vegetal e energia.

No país a área de florestas plantadas em 2011 com plantios de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. representava 74,8% e 25,2%, respectivamente, totalizando uma área de 6.515.844 ha. No Estado do Paraná a área de florestas das duas espécies citadas, correspondia a 188.153 ha de *Eucalyptus* spp. e 658.707 ha de *Pinus* spp. (ABRAF, 2012).

Devido ao tamanho continental do território brasileiro, há o emprego de várias espécies arbóreas, além de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp., para a composição dos plantios silviculturais em suas diferentes regiões. Uma vez que cada região apresenta características edafoclimáticas distintas, as espécies plantadas, sobretudo, as exóticas devem possuir características capazes de tolerar os fenômenos naturais, mantendo a produção de madeira em níveis competitivos.

Assim, na região sul do Brasil, as espécies utilizadas devem ser capazes de sobreviver e desenvolver-se às temperaturas baixas, por vezes inferiores a 0°C, frequentes no inverno dessa porção austral do país (CARPANEZZI et al., 1988). Durante muitos anos, os cultivos com espécies de *Pinus* alavancaram as atividades de reflorestamento na maior parte da região sul do Brasil. Credita-se isso ao fato dessas espécies apresentarem características como a tolerância à baixa temperatura e ao bom desenvolvimento dos povoamentos nessas condições. Entretanto, nos últimos anos, as empresas de base florestal têm buscado cultivos com períodos de rotação menor que os apresentados por *Pinus* spp., com redução no período necessário para o retorno financeiro do projeto florestal.

Devido à grande adaptabilidade apresentada por *Eucalyptus* spp. em outras regiões do país onde foram introduzidos, os silvicultores dos estados do sul do Brasil tem buscado nessas espécies alternativas para a renovação dos seus povoamentos florestais. Entretanto, a maioria das espécies de *Eucalyptus* cultivadas nas regiões tropicais do Brasil não apresenta

capacidade para suportar algumas condições apresentadas nas porções mais austrais do território brasileiro, como as baixas temperaturas e, dessa forma tem o seu cultivo prejudicado ou inviabilizado.

Dentre as espécies de eucaliptos pesquisadas no intuito de contornar esse problema, o *Eucalyptus benthamii*, proveniente de planícies ao longo do rio Nepean na Austrália, tem-se mostrado promissor para plantios em locais de baixas temperaturas no inverno. Contudo, ainda não há muitas informações sobre a espécie, incluindo-se aspectos sobre a produção de mudas (HIGA, 1999).

Nos cultivos florestais o plantio é realizado por meio de mudas que são previamente produzidas nos viveiros.

As formas de propagação utilizadas pelos eucaliptocultores para a produção de mudas são: a sementeira e a estaquia, essa última mais conhecida por clonagem. A primeira produz indivíduos com maior variabilidade, capazes de se adaptarem às mais diversas condições edafoclimáticas; enquanto a segunda seleciona indivíduos homogêneos, geneticamente superiores, capazes de formarem plantios com maior produtividade e uniformidade.

A qualidade das mudas de uma área plantada é um dos fatores determinantes para o bom desenvolvimento futuro das árvores, conseqüentemente, a produtividade está diretamente relacionada à qualidade das mudas. Características como a identidade genética, vigor e estado fitossanitário são fundamentais para um plantio que garanta as características comerciais almejadas tais como: o rápido crescimento inicial e a ausência de pragas e doenças que podem prejudicar a cultura (SIMÕES, 1987; BORGES et al., 2009).

O bom manejo das mudas vai interferir no crescimento da parte aérea e radicular, no diâmetro do colo, no peso da área foliar e radicular assim como, na capacidade das plantas de resistir ao ataque de pragas e doenças. Esses fatores, quando bem equilibrados, garantem o maior índice de sobrevivência das mudas no campo, melhor desempenho frente às adversidades ambientais e melhor crescimento inicial. O controle dos fatores umidade e temperatura serão determinantes para o sucesso nessa fase da planta, assim como a condição nutricional e o manejo das mudas no viveiro (SIMÕES, 1987; WENDLING & FERRARI, 2008).

Portanto, é necessário que se estude métodos que visem melhorar a qualidade de mudas florestais, se possível com menor tempo de viveiro, reduzindo-se o risco de ataques de pragas e doenças e ainda com menor uso de agrotóxicos, uma vez que há uma pressão da sociedade para a redução do uso desses produtos.

Uma das alternativas é a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPRs). Estas rizobactérias habitam a rizosfera de plantas e são capazes de atuar no controle biológico de fitopatógenos e podem promover o desenvolvimento de plantas, melhorando as condições nutricionais das mesmas. (BORGES et al., 2009; ROMEIRO, 2007a). Para tal, esses micro organismos podem atuar de diversas formas; podem aumentar a capacidade fotossintética de plantas (ZHANG et al., 2008), solubilizar fósforo, produzir sideróforos, fixar nitrogênio; além de serem agentes de controle biológico por meio de antagonismo direto e indução de resistência na planta (COMPANT et al., 2005).

Na eucaliptocultura, rizobactérias têm sido utilizadas na promoção do enraizamento de clones e têm demonstrado desempenho satisfatório na produção de mudas clonais de *E. globulus* (DÍAZ et al., 2009), *E. cloeziana*, *E. grandis* e *E. urophylla* (MAFIA et al., 2009), sendo inexistente estudos com *E. benthamii*.

Dessa forma, o presente trabalho justifica-se pela ausência de informações sobre o uso dessas PGPRs na produção de mudas de *Eucalyptus benthamii*, sobretudo, no método de produção seminal, muito utilizado por pequenos e médios viveiros do estado do Paraná; podendo ser uma alternativa simples, de baixo custo e de melhoria na produção de mudas aplicadas em viveiros de baixa tecnificação.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e selecionar rizobactérias com potencial na germinação e promoção do crescimento de mudas de *E. benthamii* e testar bactérias do filoplano em mudas da mesma espécie.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Isolar e selecionar rizobactérias de solo cultivado com plantios de *E. benthamii* e de *Pinus* sp.
- b) Testar bactérias residentes do filoplano de *E. benthamii* aplicadas como rizobactérias em mudas da cultura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Eucalyptus* spp.

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, que se caracteriza por apresentar espécies arbóreas e ou arbustivas, em que as folhas possuem óleos em suas glândulas especializadas. Portanto, possuem aromas característicos e o limbo foliar possui uma nervura marginal coletora. Espécies dessa família desempenharam papel imprescindível para a sobrevivência de povos como os Aborígenes da Austrália, tendo em *Eucalyptus* spp. espécies de grande importância (AUSTRALIAN NATIONAL BOTANIC GARDENS, 2011).

O gênero é considerado de maior importância para a família por possuir o maior número de espécies, nas quais são mais de 600 já catalogadas. A maioria dessas espécies tem o centro de diversidade na Austrália e países próximos: Filipinas, Nova Zelândia e Indonésia (BROOKER et al., 2002).

A diferenciação morfológica baseia-se na forma das flores, as quais não apresentam pétalas nem sépalas (AUSTRALIAN NATIONAL BOTANIC GARDENS, 2011). No caule algumas espécies podem possuir lignotuber, que é um tubérculo lenhoso subterrâneo, sendo este, muitas vezes o responsável pelo crescimento, resistência e capacidade de regeneração e um órgão característico de dada espécie (LAMPRECHT, 1990).

O eucalipto nas suas diversas variações, é cultivado mundialmente em locais de clima temperado a tropical. Destacam-se países como a África do Sul, China, Índia e Brasil (ELDRIDGE et al., 2001).

No Brasil, o seu cultivo com fins comerciais, iniciou-se pelo engenheiro Edmundo Navarro de Andrade, que quando nomeado diretor do horto florestal da Companhia Paulista de Estradas de Ferro buscou plantar certa gama de espécies florestais a fim de verificar as mais interessantes economicamente. Com um rigor científico nos seus experimentos, ele verificou que as espécies desse gênero cresciam mais rápido quando comparadas com espécies arbóreas brasileiras, bem como a qualidade da madeira, derrubando-se a idéia que se tinha na época de que quanto mais lento o crescimento, melhor seria a madeira. Dessa forma, sabendo-se da principal demanda da companhia de estrada de ferro por madeira para produção de energia renovável, combustível, estacas, toras, postes e dormentes constantemente, buscou-se no eucalipto a solução para o suprimento de madeira em menor tempo (ANDRADE, 1961).

Posteriormente, com a introdução da Lei de Incentivos Fiscais para plantios florestais, houve a expansão da cultura pelo Brasil, em grande parte para suprir as demandas de madeira para setores da siderurgia e empresas de celulose e papel (MELO et al., 2008).

O Brasil é o sétimo país no *ranking* mundial em florestas plantadas, atrás da China, Índia, Rússia, Estados Unidos, Japão e Indonésia (ABRAF, 2012). O país é o segundo produtor mundial de madeira de *Eucalyptus* spp., caracterizando-se por plantios intensivos e de alta produtividade. (ALFENAS et al., 2009).

A produtividade brasileira gira na casa dos $35\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, com picos acima de $60\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, destinando boa parte da madeira aos setores de papel e celulose, siderurgia a carvão vegetal, painéis de madeira industrializada, energia, produtos florestais não madeireiros entre outros (SBS, 2010; ABRAF, 2012).

Existem diversas espécies de *Eucalyptus* as quais apresentam características variadas quanto às necessidades edafoclimáticas. Por isso, ao se introduzir uma espécie em regiões distintas de sua ocorrência natural, deve-se fazer uma análise criteriosa na escolha da espécie de acordo com o local de introdução, o que vai condicionar o sucesso ou fracasso dos plantios; ou seja, deve-se sempre levar em consideração o hábitat natural para cultivá-las em condições semelhantes a este (ANDRADE, 1961).

Portanto, em um país de dimensões continentais como o Brasil, além das características oriundas da própria espécie a ser introduzida, é preciso atentar-se para as *nuances* climáticas e ambientais de cada localidade do país (LAMPRECHT, 1990). Isso pode ser evidenciado em alguns plantios de *Eucalyptus* sp. na região sul brasileira em que a inadaptabilidade das espécies cultivadas e a inobservância das condições locais acarretam na morte de árvores em cultivos pela ocorrência de geadas (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

3.2 *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage

O *Eucalyptus benthamii* é uma espécie restrita à costa do Estado de Nova Gales do Sul, na Austrália, em uma área que fica a sudoeste de Sidney, considerada uma espécie de plantas raras ou ameaçadas. Com a chegada do colonizador europeu, a maior parte do hábitat natural dessa espécie foi substituída pela agricultura ou submersa devido à barragem Warragamba. Resta apenas um pequeno fragmento florestal da formação original, contendo poucos indivíduos dispersos ao longo do rio Nepean entre Wallacia e Camden e uma população maior em Kedumba Creek ($33^{\circ} 49'$ Latitude Sul; $150^{\circ} 22'$ Longitude Oeste) (BENSON, 1985).

O *E. benthamii*, em seu local de origem, desenvolve-se em terrenos férteis, argilosos e com boa quantidade de água, o que caracteriza os solos almejados para a agricultura (CARPENEZZI et al., 1988; PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

A floração ocorre nos meses de abril e maio e a frutificação entre os meses de abril a junho, e outubro a dezembro. A produção de sementes maduras é possível a partir de 6 a 10 anos, em condições naturais (BENSON, 1985).

A madeira é considerada moderadamente dura, sendo o cerne e o alburno bem diferentes entre si. O primeiro caracterizado por uma coloração marrom avermelhada e o segundo, amarelo rosado (NISGOSKI et al., 1998).

Em um estudo realizado na região nordeste do Brasil, com dez espécies de *Eucalyptus* spp., *E. benthamii* comportou-se de modo similar às outras espécies avaliadas (COUTINHO, 2004). Em plantios experimentais tem-se observado potencialidade para o cultivo nos Estados da região sul, principalmente considerando sua performance em áreas que ocorrem geadas severas (HIGA et al., 2003). Essa característica somada ao rápido crescimento da árvore são fatores que tem despertado o interesse pela espécie (SILVA, 2008).

Em ensaios realizados no Estado do Paraná, *E. benthamii* apresentou crescimento superior em relação ao *E. dunnii*, uma espécie com considerável área de cultivo no Estado e que também tem características de desenvolvimento sob estresse de congelamento (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

No Estado do Paraná, segundo Paludzyszyn Filho et al. (2006) o *E. benthamii* não possui restrições quanto à precipitação, tanto em relação à presença quanto ausência de chuvas, e a temperatura limita-se à máxima de 30°C e mínima de -6°C, que é comum em algumas regiões do Estado.

De acordo com Higa (1999), plantas dessa espécie não apresentaram tortuosidade causada por geada, partindo-se do critério de uso final como madeira serrada. Entretanto, quando avaliada a qualidade da madeira por meio de variáveis como contração e coeficiente de anisotropia concluiu-se que se trata de uma madeira instável e com alta intensidade de defeitos na madeira serrada. Em relação ao teor de cinzas foi considerado como carvão de boa qualidade, podendo ser utilizado na siderurgia. Quanto ao desdobro, a madeira demonstrou forte tendência ao empenamento indicando a necessidade de melhoramento para o uso em serraria (HIGA & PEREIRA, 2003).

Os cultivos de *E. benthamii* no sul do Brasil tem destinado a madeira para fins energéticos todavia, vislumbra-se potencialidade para a indústria de papel e celulose (NISGOSKI et al., 1998).

Mesmo apresentando as características necessárias para plantio em regiões frias, o *E. benthamii* é considerado uma espécie recalcitrante, ou seja, suas sementes não podem ser desidratadas e armazenadas por longos períodos de tempo, pois perdem a viabilidade rapidamente. O uso de propagação vegetativa também apresenta limitações visto que os clones têm apresentado resultados pouco expressivos quanto ao enraizamento. Essa característica de recalcitrância tem sido reportada para diversas espécies de eucalipto de clima subtropical (SANTOS et al., 2007).

As sementes de *E. benthamii* apresentam germinação bastante desuniforme e aliado à baixa viabilidade, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos que proporcionem melhoria na germinação e produção das mudas (SILVA, 2008).

3.3. Produção de mudas florestais

A produção de mudas para reflorestamento, com as características desejáveis, mostra-se ideal quando se semeia direto no solo, pois ao emergir da semente, a radícula vai aos poucos ocupando as frações de solo ideais para o seu desenvolvimento, de acordo com o estágio fenológico da planta (CARNEIRO 1995). Conseqüentemente tem-se maior produção, pois há o equilíbrio entre a parte aérea e o sistema radicular da planta.

Contudo o plantio de sementes florestais a campo mostra-se desvantajoso, pois as taxas de sobrevivência são menores e acarreta em maiores cuidados e custos, tem-se então utilizado o plantio de mudas produzidas em viveiro e posteriormente levadas para o campo (SIMÕES, 1987).

Com a Lei de Incentivos Fiscais, a disseminação da cultura do eucalipto deu-se inicialmente pelo plantio de mudas de origem seminal, com baixo nível de tecnificação, até fins da década de 1970 (MELO et al., 2008). Porém, esses povoamentos apresentavam problemas quanto à produtividade, devido a heterogeneidade dos plantios e pela alta incidência do cancro (*Chrysosporthe cubensis*). Soma-se a esses fatores o desconhecimento da procedência genética de muitas linhagens de sementes utilizadas e à falta de estudos de zoneamento ecológico das espécies. Esses fatores impulsionaram o desenvolvimento da técnica de propagação vegetativa (CAMPINHOS & IKEMORY, 1983).

A propagação vegetativa baseia-se na reprodução assexuada de partes da planta com o intuito de originar indivíduos idênticos à planta mãe (FERRARI et al., 2004). Segundo Alfenas et al. (2009), além da manutenção das características da planta mãe, as florestas formadas por mudas clonais mostram-se mais homogêneas e apresentam crescimento mais

rápido. É uma técnica amplamente difundida entre grandes reflorestadoras, entretanto onera a produção de mudas devido à tecnologia empregada.

Para os pequenos viveiristas, a produção de mudas florestais baseia-se principalmente no uso de sementes em que não há necessidade do emprego de outros custos fora a aquisição do material propagativo. Embora povoamentos formados por mudas de origem seminal apresentem maior heterogeneidade, viveiristas com menor poder de investimento utilizam essa forma de propagação devido às facilidades e aos custos dessa técnica (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

Além das questões envolvidas no custo da produção, a propagação clonal de *E. benthamii* e de seus híbridos, ainda é fato incipiente limitando-se apenas em projetos de pesquisa como realizado por Brondani et al. (2009); e não há disponibilidade de cepas para serem adquiridas por viveiristas, ou seja, não há clones comerciais.

Outra dificuldade encontrada para o desenvolvimento da propagação clonal por pequenos viveiristas é o melhoramento de procedências em que o processo de avaliação e seleção de matrizes, que requer sólidos conhecimentos de melhoramento florestal, fato que não corresponde a realidade de pequenos produtores. Sendo assim, a única possibilidade para a produção de mudas de *E. benthamii* atualmente é por meio de aquisição de sementes, que na maioria das vezes são importadas da Austrália ou adquiridas de poucos pomares existentes no Brasil (SANTOS et al., 2007).

Algumas empresas florestais tem investido na obtenção de cepas de qualidade superior para a propagação clonal de *E. benthamii* ou mesmo a sua hibridação com outras espécies. Vislumbra-se em um futuro próximo que essas empresas passem a produzir mudas da espécie e seus híbridos por meio do processo vegetativo e que pequenos viveiros continuem utilizando sementes para a sua produção. Em ambas as situações, espera-se conseguir plantios de alta produtividade tendo como suporte as mudas que o originaram (SIMÕES, 1987; CARNEIRO, 1995; GRAÇA et al., 1999).

Tendo em vista as poucas pesquisas relacionadas à produção de mudas de *E. benthamii*, a recalcitrância da espécie, o grande número de pequenos viveiros florestais encontrados no interior do Paraná e resultados de pesquisas, com PGPR tem-se um cenário no qual o uso dessas bactérias pode ser uma ferramenta importante na propagação de mudas de *E. benthamii*.

3.4 PGPRs

As rizobactérias benéficas, também conhecidas como PGPRs (Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas), são micro organismos que podem atuar como promotores de crescimento de plantas (ROMEIRO, 2007). Podem colonizar o sistema radicular de plantas, promover o crescimento, controlar doenças, aumentar a produtividade de culturas, aumentar o potencial de enraizamento e a biomassa de plantas por meio de vários mecanismos (KLOPPER & SCHROTH, 1978 citado por ALFENAS et al., 2009; SILVA et al., 2003; ROMEIRO, 2007a; MAFIA et al., 2009; ROMEIRO & GARCIA, 2009).

Habitam a superfície de raízes de plantas e se nutrem de exsudados e lisados liberados pelo sistema radicular de plantas bem como fazem da rizosfera seu nicho ecológico, abrigando-se de intempéries e da microbiota antagonista (LUCY et al., 2004).

Segundo Lugtenberg & Dekkers (1999), a associação das rizobacterias com as plantas pode exercer controle biológico de doenças por meio da produção de metabólitos antifúngicos, pode exercer fitoestimulação (promoção do crescimento por efeitos sinérgicos na síntese de fitormônios), biofertilização pelo aumento da disponibilidade de nutrientes como nitrogênio, fosfatos, micronutrientes e, ainda, são capazes de degradar produtos químicos orgânicos fitotóxicos, bem como desempenham papel importante na fitorremediação.

Os estudos realizados com rizobactérias demonstram que cada isolado de rizobactéria age de forma particular, seja na promoção do crescimento, no controle biológico ou mesmo na nutrição das plantas. O uso de rizobactérias é tido como prática usual na agricultura chinesa (CHEN et al., 1996, citado por ROMEIRO 2007). No Brasil, a utilização desses micro-organismos é, na maioria das vezes, reportada em cultivos agrícolas como pepino, cujos resultados do uso desse micro organismos mostraram-se eficientes na melhoria da qualidade de mudas dessa espécie (SILVEIRA et al., 2004). Na cultura da alface, propágulos bacterianos atuaram promovendo o crescimento de plantas destacando-se do tratamento controle que fora constituído por plantas não microbiolizadas por bactérias (FREITAS et al., 2003; FERREIRA et al., 2011). No citrus, avaliando-se a capacidade de rizobactérias em diminuir a percentagem de infecção causada por *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora*, observou-se inibição do crescimento micelial do fitopatógeno, além da promoção do crescimento de plântulas (AMORIM & MELO, 2002). Em macieiras, em estudos realizados por Aslantas et al. (2007), observou-se o aumento da produção de frutos quando as plantas foram inoculadas com PGPR comparando-se com o tratamento controle, mas que esse resultado variava com o porta-enxerto, cultivares e os tratamentos.

Na área florestal, a sua utilização como promotoras de crescimento de plantas, é fato ainda novo. Os primeiros relatos do uso de PGPRs na área florestal deram-se na cultura do pinus há pouco mais de vinte anos no Canadá no qual observou-se o aumento significativo da taxa de emergência de plantas além do aumento de peso fresco de parte aérea e radicular, altura e diâmetro do colo (CHANWAY & HOLL, 1991).

Há vários estudos envolvendo o uso de PGPRs na área florestal em mudas de *Pinus* sp. Em trabalhos de Brunetta et al. (2007 e 2010) foram identificadas melhorias significativas no incremento da biomassa aérea e radicular, e no Índice de Qualidade de Dickson em mudas de *Pinus taeda* e, em mudas de *P. elliottii*, também se observou aumento da biomassa aérea. Segundo Enebak et al. (1998), alguns propágulos de PGPR aumentaram a velocidade de germinação de sementes de *Pinus* sp., mas houve aqueles que tiveram efeitos negativos no crescimento.

Outra espécie florestal testada com o uso de rizobactérias foi o carvalho (*Quercus ilex* ssp. Ballota). Estudos realizados por Domenech et al. (2004), foi observado que rizobactéria do gênero *Bacillus* foi capaz de promover a germinação de sementes de carvalho, sendo melhor que o tratamento controle; além de ter sido capaz de inibir o crescimento fúngico determinado pela análise de ergosterol e quitina.

Mafia et al. (2005) observaram em clones de *Eucalyptus* sp. que as estacas tratadas com rizobactérias, apresentaram maior desenvolvimento do sistema radicular.

Na eucaliptocultura os primeiros trabalhos com o uso de rizobactérias, limitaram-se à promoção de enraizamento de clones (Teixeira, 2001). Até o momento são inexistentes estudos com o uso de rizobactérias para a promoção de germinação de sementes e crescimento de mudas de *E. benthamii*.

Atualmente, já existe o registro de produtos à base de rizobactérias em alguns países, como a China em que são distribuídos para os produtores com a finalidade de aumento da produtividade e qualidade dos plantios agrícolas (CHEN et al., 1996, citado por ROMEIRO, 2007). Nos Estados Unidos é possível encontrar produtos de origem biológica, disponíveis nas lojas com efeito na promoção de crescimento em plantas (PAULITZ & BELANGER, 2001). No Brasil, um produto formulado a base desses micro-organismos tem como nome Rizolyptus® e se restringe ao enraizamento de clones de algumas espécies de *Eucalyptus* (GRUPO BIO SOJA, 2008).

Atualmente, buscam-se métodos que promovam o crescimento rápido e vigoroso de plantas e que ao mesmo tempo promova o controle biológico das doenças e pragas (MORANDI & BETTIOL, 2009; ROMEIRO & GARCIA, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécie modelo para a realização dos ensaios

O material vegetal utilizado constituiu-se por sementes de *Eucalyptus benthamii* cedidas pelas empresas Klabin S.A. e Golden Tree Reflorestadora LTDA.

4.2 Descrição do local de realização dos ensaios

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Proteção Florestal e no Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Estadual do Centro-oeste (UNICENTRO), Irati, Paraná.

Segundo classificação de Köppen-Geiger, o tipo clima da região de Irati é identificado com Cfb; caracterizando-se como clima temperado com temperatura média dos meses mais frios abaixo de 18° com ocorrência de geadas, verão fresco com temperaturas dos meses mais quentes abaixo de 22°C e sem estação de seca definida (IAPAR, 2012).

4.3. Inóculo

Para a realização dos ensaios, foram utilizados isolados bacterianos oriundos do filoplano de plantas de *E. benthamii*, isolados de bactérias autóctones de rizosfera dessa mesma espécie e bactérias isoladas da rizosfera de *Pinus* sp.

Oito isolados residentes do filoplano pertencentes à coleção do Laboratório de Proteção Florestal foram utilizados: UBF 02, UBF 03, UBF 04, UBF 05, UBF 06, UBF07, UBF 08 e UBF 10.

4.4 Isolamento das bactérias

Para o isolamento das rizobactérias seguiu-se metodologia proposta por Romeiro (2007) com algumas modificações. Coletou-se solo rizosférico de plantas de *E. benthamii* com cerca de dois anos de idade e de *Pinus* sp. com aproximadamente seis anos, a uma profundidade de 1 a 10 cm e a uma distância de até 4 cm da raiz, coletando cerca de 100 g de solo contendo aderido a esse fragmento, raízes.

Essas amostras foram levadas ao laboratório e posteriormente retiradas alíquotas de 10 g e depositadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo solução salina (0,85% NaCl) (v/v), esterilizada. Os frascos foram agitados manualmente por um minuto a cada meia hora

num período de 12 horas à temperatura ambiente, a fim de que as bactérias fossem suspendidas das partículas de solo e passassem para a solução.

Após, procedeu-se a diluição seriada da suspensão, fator 10, coletando-se uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana e depositando-a em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85% NaCl) (v/v) esterilizada. Utilizou-se 100 µL de cada diluição que foram pipetadas para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Trypticase Soy Agar) e espalhado com alça de Drygalski. Cada placa foi incubada em BOD a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 a 48 horas.

As colônias individualizadas formadas sobre a superfície do meio foram repicadas com alça de platina para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura inclinado, incubando-se a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em BOD por um período de 24 a 48 horas e posteriormente preservados em geladeira a 4°C , pelo método tubo-a-tubo, repetindo-se o processo a cada três meses (ALFENAS & MAFIA, 2007).

4.5 Ensaio de Colonização Radicular

Para a realização do ensaio de colonização radicular foram utilizados tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro e 14 cm de comprimento, contendo 10 mL de meio de cultura ágar-água (0,4%) (p/v), esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os isolados bacterianos foram repicados dos tubos de ensaios para o centro de placas de Petri contendo meio TSA. Sobre estas dispensou-se 100 µL de solução salina (0,85% NaCl) (p/v) esterilizada e procedeu-se o espalhamento com alça de Drygalski, incubando-se, em seguida, a 28°C por cerca de 24 a 48 horas. Após, o crescimento bacteriano foi suspenso em solução salina (0,85% NaCl) (p/v) e a concentração ajustada por espectrofotômetro para absorvância 0,4 de 600 nm.

As sementes de *E. benthamii* foram lavadas em água corrente e microbiolizadas nas suspensões de propágulos de células das rizobactérias e bactérias residentes do filoplano por 12 horas em temperatura ambiente .

Após a microbiolização, procedeu-se à semeadura nos tubos de ensaio contendo meio ágar-água, depositando-se uma semente por tubo. Estes foram mantidos em laboratório em condições de temperatura e luz ambiente. Logo que o processo germinativo foi observado (visualização do desenvolvimento de primórdios radiculares), os tubos de ensaio foram avaliados diariamente contra a luz solar, quanto a capacidade de colonização radicular (SILVA et al., 2003) e o efeito das rizobactérias na germinação das sementes.

O ensaio foi realizado no delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, tendo como controle sementes imersas em água por período igual ao da microbiolização. Ao final da avaliação, selecionou-se os isolados com efeito de promoção para o ensaio de seleção massal.

4.6 Ensaio de Seleção Massal

O ensaio de seleção massal foi realizado em três etapas sendo denominados de subgrupo, os mesmos consistiram da microbiolização das sementes de *E. benthamii* pelos isolados selecionados no ensaio de colonização radicular, com suspensão bacteriana ajustada para OD 600nm, com concentração ajustada para 0,4, por 12 horas. Procedeu-se a semeadura em tubetes de 55 cm³, previamente desinfestados em água a 80°C por um minuto, contendo o substrato Macplant[®].

Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação até a emergência das sementes e posteriormente foram transferidos para casa de sombra (sombrite de 50%), onde permaneceram por 8 dias. Em seguida foram conduzidos para área de pleno sol, até o fim do ensaio. As adubações foram realizadas a partir do trigésimo dia após a semeadura com solução de NPK (4-14-8), na concentração 10 g.L⁻¹, 5mL por tubete, uma vez por semana até o fim do experimento.

No ensaio com o primeiro subgrupo foram testados 30 isolados; no segundo subgrupo 50 e no terceiro, 22. O tratamento controle consistiu de sementes imersas por 12 horas em água.

A partir da primeira semana após a semeadura realizou-se, diariamente, a contagem das sementes germinadas. Aos 120 dias após a semeadura, foram avaliados: altura das mudas, número de folhas, peso seco de raiz e parte aérea, diâmetro do coleto e relação altura/diâmetro do coleto (H/D) e diâmetro do coleto/altura (D/H). Também foi calculado do Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

Os ensaios foram realizados no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições para cada tratamento.

Procedeu-se a ANOVA para os resultados obtidos, e quando pertinente, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, com 95% de probabilidade, com o uso do *software* SAEG.

4.7 Ensaio de confirmação

O ensaio de confirmação foi realizado com os isolados que mostraram-se promissores na seleção massal. Para tanto, sementes de *E. benthamii* foram microbiolizadas com suspensão de propágulos de bactérias à 0,4 em OD 600nm, por 12 horas. Após, procedeu-se a semeadura das sementes em tubetes de 55 cm³, previamente desinfestados em água a 80°C por um minuto, contendo o substrato Macplant[®]. A partir da semeadura, avaliou-se o número de sementes germinadas e, após 90 dias foram avaliados: altura das mudas, número de folhas, peso seco de raiz e parte aérea, diâmetro do coleto e relação altura/diâmetro do coleto (H/D) e diâmetro do coleto/altura (D/H). Também foi calculado do Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

O delineamento estatístico foi o em blocos casualizados, com dez blocos, oito unidades amostrais para cada tratamento, sendo o controle constituído por sementes submersas em água por 12 horas. Os resultados foram analisados por meio do teste T a 95% de probabilidade utilizando-se o software SAEG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de Rizobactérias

Foram obtidos neste trabalho 117 isolados de rizobactérias, sendo 52 isolados provenientes da rizosfera de *Pinus* sp. e 65 da rizosfera de *Eucalyptus benthamii* (Tabela 01). A estes isolados, foram acrescentados 8 isolados de bactérias residentes do filoplano previamente obtidos, que apresentaram resultados promissores na indução do enraizamento de mudas de *E. benthamii* (dados não publicados). Segundo Lindow & Brandl (2003), bactérias residentes do filoplano podem colonizar diferentes habitats.

Tabela 01- Isolados de rizobactérias obtidos a partir de solo rizosférico de *E. benthamii* e *Pinus* sp. e os respectivos códigos utilizados.

Isolados	Rizobactérias de <i>E. benthamii</i>	UBK 01	UBK 02	UBK 03	UBK 04	UBK 05	UBK 06	UBK 07	
		UBK 08	UBK 09	UBK 10	UBK 11	UBK 12	UBK 13	UBK 14	
		UBK 15	UBK 16	UBK 17	UBK 18	UBK 19	UBK 20	UBK 21	
		UBK 22	UBK 23	UBK 24	UBK 25	UBK 26	UBK 27	UBK 28	
		UBK 29	UBK 30	UBK 31	UBK 32	UBK 33	UBK 34	UBK 35	
		UBD 01	UBD 02	UBD 03	UBD 04	UBD 05	UBD 06	UBD 07	
		UBD 08	UBD 09	UBD 10	UBD 11	UBD 12	UBD 13	UBD 14	
		UBD 15	UBD 16	UBD 17	UBD 18	UBD 19	UBD 20	UBD 21	
		UBD 22	UBD 23	UBD 24	UBD 25	UBD 26	UBD 27	UBD 28	
		UBD 29	UBD 30						
		Rizobactérias de <i>Pinus</i> sp.	UBP 01	UBP 02	UBP 03	UBP 04	UBP 05	UBP 06	UBP 07
			UBP 08	UBP 09	UBP 10	UBP 11	UBP 12	UBP 13	UBP 15
			UBP 16	UBP 17	UBP 18	UBP 19	UBP 20	UBP 21	UBP 22
			UBP 23	UBP 24	UBP 25	UBP 26	UBP 27	UBP 29	UBP 30
			UBP 31	UBP 32	UBP 33	UBP 34	UBP 35	UBP 36	UBP 37
	UBP 38		UBP 39	UBP 40	UBP 41	UBP 42	UBP 43	UBP 44	
	UBP 45		UBP 46	UBP 47	UBP 48	UBP 49	UBP 50	UBP 51	
	UBP 52		UBP 53	UBP 54					

UBK: Unicentro-Benthamii-Kátia; UBD: Unicentro-Benthamii-Diego; UBP: Unicentro-Benthamii-Pinus.

Segundo Yanes et al. (2012) o número de 125 isolados não é tido como o ideal para a realização de ensaios que visam selecionar isolados de rizobactérias com capacidade de promoção de crescimento (YANES et al., 2012).

Encontra-se na literatura trabalhos em que isolados de rizobactérias são utilizados no filoplano de plantas e o oposto, tendo resultados promissores tanto no biocontrole quanto na promoção de crescimento (CARRER FILHO et al., 2008; GARCIA & ROMEIRO, 2011). Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho, com o uso de bactérias do filoplano, foram diferentes, ou seja, tais propágulos não tiveram efeito sobre as variáveis avaliadas (Tabela 03).

5.2. Ensaio de Colonização Radicular

Dos 125 isolados estudados, 100 foram capazes de colonizar as raízes de *E. benthamii*. Destes, 45 (83,53%) foram provenientes da rizosfera de *Pinus* sp.; 47 (72,31%) da rizosfera de *E. benthamii* e 8 (100%) provenientes do filoplano de mudas de *E. benthamii* (Tabelas 02, 03 e 04).

Tabela 02 - Isolados de rizobactérias de *E. benthamii* com capacidade de colonização radicular em ensaio *in vitro*.

Rizobactérias de <i>E. benthamii</i>						
UBK 01	UBK 02	UBK 03	UBK 04	UBK 06	UBK 07	UBK 08
UBK 10	UBK 11	UBK 12	UBK 14	UBK 16	UBK 17	UBK 18
UBK 19	UBK 20	UBK 21	UBK 22	UBK 23	UBK 24	UBK 25
UBK 26	UBK 27	UBK 28	UBK 29	UBK 30	UBK 31	UBK 32
UBK 33	UBK 34	UBK 35	UBD 01	UBD 02	UBD 04	UBD 06
UBD 09	UBD 10	UBD 12	UBD 13	UBD 15	UBD 16	UBD 17
UBD 21	UBD 25	UBD 26	UBD 29	UBD 30		

UBK: Unicentro-Benthamii-Kátia; UBD: Unicentro-Benthamii-Diego.

Tabela 03 - Isolados de rizobactérias de *Pinus* sp. com capacidade de colonização radicular em ensaio *in vitro*.

Rizobactérias de <i>Pinus</i> sp.						
UBP 01	UBP 02	UBP 03	UBP 04	UBP 05	UBP 06	UBP 07
UBP 08	UBP 09	UBP 10	UBP 11	UBP 12	UBP 13	UBP 15
UBP 16	UBP 17	UBP 18	UBP 19	UBP 20	UBP 22	UBP 23
UBP 24	UBP 25	UBP 26	UBP 27	UBP 28	UBP 33	UBP 34
UBP 35	UBP 36	UBP 37	UBP 38	UBP 39	UBP 40	UBP 41
UBP 42	UBP 43	UBP 44	UBP 45	UBP 46	UBP 47	UBP 48
UBP 49	UBP 51	UBP 54				

UBP: Unicentro-Benthamii-Pinus.

Tabela 04 - Isolados de Bactérias Residentes do Filoplano de *E. benthamii* com capacidade de colonização radicular em ensaio *in vitro*.

Bactérias Residentes do Filoplano							
UBF 02	UBF 03	UBF 04	UBF 05	UBF 06	UBF 07	UBF 08	UBF 10

UBF: Unicentro-Benthamii-Filoplano

A colonização radicular foi detectada por meio visual pela presença de uma zona túrbida no entorno do sistema radicular (SILVA et al., 2003) (Figura 1).

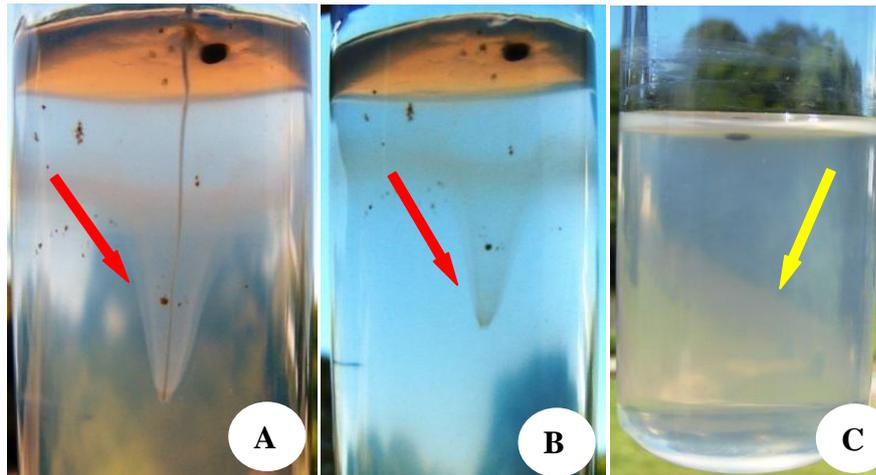


Figura 01- Evidenciação da colonização radicular por meio de zona turbida leitosa, circundante aos pelos radiculares. A e B: sistema radicular de mudas de *E. benthamii* colonizados por propágulos de rizobactérias (setas vermelhas). C: zona de crescimento radicular de muda de *E. benthamii* do tratamento controle (água), com ausência de zona turbida leitosa (seta amarela).

Segundo Mafia et al. (2009), em ensaio de colonização radicular no meio ágar-água, de 50 isolados testados somente 16 foram capazes de colonizar o sistema radicular. Porém, quando se utilizou um meio de cultura enriquecido teve-se o aumento de isolados capazes de colonizar o sistema radicular.

É possível que a suplementação nutricional aumente a capacidade das rizobactérias em colonizar o sistema radicular. Aysha et al. (2012) observaram que o enriquecimento do meio de cultura proporcionou maior desenvolvimento de isolados de PGPR em placas de Petri, tendo-se colônias mais vigorosas e que puderam originar colônias mais aptas à colonização radicular. Contudo, há de se ponderar que, ao microbiolizar sementes com propágulos de bactérias cultivados em meio enriquecido, há uma chance de ocorrer estímulo à competição pela microbiota circunvizinha pelo acréscimo de requisitos nutricionais exógenos na rizosfera beneficiando os micro-organismos já existentes e, dessa forma, quando em condição *in vivo*, haver redução da capacidade das bactérias em se estabelecer na rizosfera por mecanismos antagônicos da microbiota autóctone.

Assim assume-se no presente trabalho que as rizobactérias que não colonizaram o sistema radicular não podem ser consideradas PGPR e que o estímulo a esse evento por meio de suplementação nutricional com meios de cultura enriquecidos não é desejado pelos argumentos postos bem como pelo aumento do custo do processo. Mesmo não havendo a

suplementação nutricional do meio, no presente trabalho 80% dos isolados testados foram capazes de colonizar o sistema radicular, indicando um bom parâmetro.

Segundo Kloepper et al. (1980) citado por Chanway et al. (1991) um dos critérios para que uma rizobactéria ou mesmo bactéria do filoplano seja considerada uma PGPR (Plant Growth – Promoting Rhizobacteria) é o fato de ser capaz de colonizar o sistema radicular.

Entretanto é possível que isolados que são capazes de colonizar o sistema radicular sejam deletérios ao invés de benéficos, causando necroses radiculares e a morte da planta, como foi observado por Mafia et al. (2009) ao detectar 70% de isolados benéficos e 30% deletérios, daqueles cuja colonização radicular fora observada. Estima-se que 0,6% da microbiota do solo têm função benéfica (CHEN et al., 1996 citado por ROMEIRO, 2007) e, portanto, torna-se necessário trabalhar com o maior número de isolados possíveis.

Não houveram isolados capazes de melhorar a germinação de sementes nos três ensaios realizados para a colonização radicular. Todavia, observa-se que alguns isolados tiveram efeito inibitório à germinação das sementes (Tabela 05).

Houveram isolados que foram capazes de colonizar a superfície da semente, mas que inibiram a germinação (Figura 02). Esse resultado mostra que deve haver uma avaliação rigorosa das características dos isolados de rizobactérias testados, pois há situações em que as interações podem apresentar resultados contrários aos esperados.

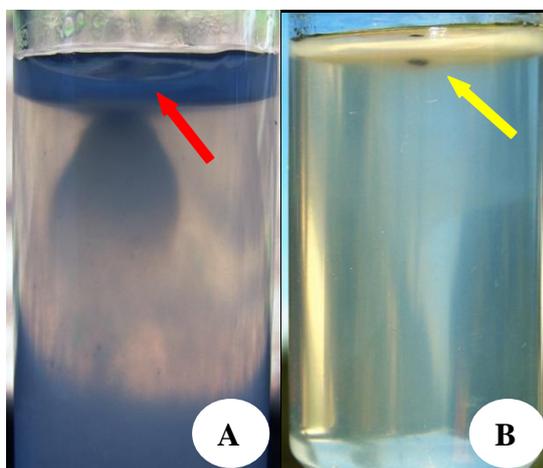


Figura 02 – A) Evidenciação da colonização superficial de semente de *E. benthamii* por meio de zona túrbida leitosa circundante a semente (seta vermelha). B) Semente de *E. benthamii* com ausência de zona túrbida leitosa (seta amarela).

Tabela 05 – Germinação *in vitro* de sementes de *Eucalyptus benthamii* previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 1.

Subgrupo 1			
Tratamento	Germinação (%)	Tratamento	Germinação (%)
Água	100 a	UBK 06	66,67 a
UBK 01	100 a	UBK 11	66,67 a
UBK 03	100 a	UBK 12	66,67 a
UBK 07	100 a	UBK 17	66,67 a
UBK 08	100 a	UBK 21	66,67 a
UBK 14	100 a	UBK 27	66,67 a
UBK 18	100 a	UBK 28	66,67 a
UBK 19	100 a	UBK 33	66,67 a
UBK 20	100 a	UBK 34	66,67 a
UBK 22	100 a	UBK 31	33,33 b
UBK 23	100 a	UBK 35	33,33 b
UBK 24	100 a	UBK 02	0 b
UBK 25	100 a	UBK 05	0 b
UBK 26	100 a	UBK 09	0 b
UBK 29	100 a	UBK 10	0 b
UBK 30	100 a	UBK 13	0 b
UBK 32	100 a	UBK 15	0 b
UBK 04	66,67 a	UBK 16	0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de confiança.

Tabela 06 - Germinação *in vitro* de sementes de *Eucalyptus benthamii* previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 2.

Subgrupo 2			
Tratamento	Germinação (%)	Tratamento	Germinação (%)
Água	100 a	UBD 30	100 a
UBD 02	100 a	UBD 01	100 a
UBD 04	100 a	UBD 07	66,67 a
UBD 05	100 a	UBD 09	66,67 a
UBD 06	100 a	UBD 12	66,67 a
UBD 08	100 a	UBD 17	66,67 a
UBD 10	100 a	UBD 21	66,67 a
UBD 13	100 a	UBD 23	66,67 a
UBD 16	100 a	UBD 26	66,67 a
UBD 18	100 a	UBD 29	66,67 a
UBD 19	100 a	UBD 14	33,33 b
UBD 20	100 a	UBD 15	33,33 b
UBD 22	100 a	UBD 03	0 b
UBD 25	100 a	UBD 11	0 b
UBD 27	100 a	UBD 24	0 b
UBD 28	100 a		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de confiança.

Tabela 07 - Germinação *in vitro* de sementes de *Eucalyptus benthamii* previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 3.

Subgrupo 3			
Tratamento	Germinação (%)	Tratamento	Germinação (%)
UBP 02	100 a	UBP 12	66,67 a
UBP 03	100 a	UBP 13	66,67 a
UBP 04	100 a	UBP 18	66,67 a
UBP 06	100 a	UBP 22	66,67 a
UBP 08	100 a	UBP 27	66,67 a
UBP 10	100 a	UBP 32	66,67 a
UBP 11	100 a	UBP 35	66,67 a
UBP 15	100 a	UBP 36	66,67 a
UBP 16	100 a	UBP 39	66,67 a
UBP 17	100 a	UBP 40	66,67 a
UBP 19	100 a	UBP 42	66,67 a
UBP 20	100 a	UBP 43	66,67 a
UBP 21	100 a	UBP 45	66,67 a
UBP 23	100 a	UBP 47	66,67 a
UBP 24	100 a	UBP 48	66,67 a
UBP 26	100 a	UBF 02	66,67 a
UBP 30	100 a	UBF 05	66,67 a
UBP 33	100 a	UBF 07	66,67 a
UBP 34	100 a	Água	66,67 a
UBP 37	100 a	UBP 01	33,33 b
UBP 41	100 a	UBP 25	33,33 b
UBP 44	100 a	UBP 38	33,33 b
UBP 46	100 a	UBP 50	33,33 b
UBP 54	100 a	UBP 5	0 b
UBF 03	100 a	UBP 29	0 b
UBF 04	100 a	UBP 31	0 b
UBF 06	100 a	UBP 49	0 b
UBF 08	100 a	UBP 51	0 b
UBF 10	100 a	UBP 52	0 b
UBP 07	66,67 a	UBP 53	0 b
UBP 09	66,67 a		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de confiança.

5.3 Ensaio de Seleção Massal

No ensaio de seleção massal houve a interferência no experimento devido à morte das mudas do tratamento controle pelo ataque de uma praga. Embora o presente trabalho não tenha como objetivo avaliar controle biológico, esse fato pode ser atribuído à capacidade de

rizobactérias em interferir no sistema de defesa da planta, como a indução de resistência. São capazes de controlar doenças por meio da produção de antibióticos os quais podem agir como determinantes no desencadeamento da resistência sistêmica induzida e contribuir para a supressão da doença (DILANTHA FERNANDO & ZHANG, 2005).

Ann (2012) testou rizobactérias contra vários fitopatógenos fúngicos e obteve resultados promissores na inibição do crescimento micelial por meio da produção de antibióticos, além da deformação das hifas dos fitopatógenos testados.

Segundo Polli et al. (2012), bactérias do gênero *Bacillus* têm ação entomopatogênica, ou seja, quando produzem corpos de inclusão cristalinos e estes são ingeridos por lagartas, as mesmas acabam morrendo, tendo assim, ação sobre o controle dessas pragas.

No presente trabalho, pelo fato de todas as plantas do tratamento controle terem sido mortas, as análises foram realizadas comparando o efeito dos isolados entre si. Na avaliação do primeiro subgrupo não foi observado o efeito de promoção por nenhum dos isolados (Tabela 08). Em relação ao segundo subgrupo, verificou-se que os isolados: UBK 01, UBK 02, UBK 04, UBK 06, UBK 08, UBK 12, UBK 20, UBK 24, UBK 25, UBK 31, UBK 32, UBK 33, UBP 25, UBP 26, UBP 33, UBP 34, UBP 35, UBP 36, UBP 41, UBP 42, UBP 43, UBP 45, UBP 48 e UBP 54 influenciaram a germinação das sementes (tabela 09 e 10) e o isolado UBK 12 teve influência na relação altura/diâmetro (D/H) (Tabela 09 e 11).

Tabela 08 – Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 1 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

Subgrupo 1	FV	Fcalc.
	Germinação	1.317 ^{ns}
	Altura (H)	1.775 ^{ns}
	Número de Folhas (NF)	1.831 ^{ns}
	Diâmetro de coleto (Dc)	1.220 ^{ns}
	Comprimento de Raiz (CR)	1.221 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Aérea (PSA)	1.435 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Radicular (PSR)	1.227 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Total (PST)	1.316 ^{ns}
	Relação PSA/PSR	0.918 ^{ns}
	Relação H/D	1.470 ^{ns}
	Relação D/H	2.055 ^{ns}
	IQD	1.426^{ns}

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo a 95% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 09 - Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 2 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD)

Subgrupo 2	FV	Fcalc.
	Germinação	1.5537 *
	Altura (H)	0.887 ^{ns}
	Número de Folhas (NF)	0.505 ^{ns}
	Diâmetro de coleto (Dc)	1.186 ^{ns}
	Comprimento de Raiz (CR)	1.207 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Aérea (PSA)	1.210 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Radicular (PSR)	0.853 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Total (PST)	0.997 ^{ns}
	Relação PSA/PSR	0.927 ^{ns}
	Relação H/D	1.871 ^{ns}
	Relação D/H	1.871*
	IQD	1.258^{ns}

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo a 95% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10 – Germinação *in vivo* de sementes de *Eucalyptus benthamii* previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 2.

Subgrupo 2			
Tratamento	Germinação (%)	Tratamento	Germinação (%)
UBK 01	83,33 a	UBK 30	50 b
UBK 04	83,33 a	UBK 34	50 b
UBK 08	83,33 a	UBP 37	50 b
UBK 20	83,33 a	UBP 40	50 b
UBK 24	83,33 a	UBK 10	33,33 b
UBP 26	83,33 a	UBK 19	33,33 b
UBP 33	83,33 a	UBK 26	33,33 b
UBP 34	83,33 a	UBK 28	33,33 b
UBP 45	83,33 a	UBK 35	33,33 b
UBK 02	66,67 a	UBP 38	33,33 b
UBK 06	66,67 a	UBP 39	33,33 b
UBK 12	66,67 a	UBP 44	33,33 b
UBK 25	66,67 a	UBP 46	33,33 b
UBK 31	66,67 a	UBP 47	33,33 b
UBK 32	66,67 a	UBP 51	33,33 b
UBP 25	66,67 a	UBK 07	16,67 b
UBP 36	66,67 a	UBK 21	16,67 b
UBP 41	66,67 a	UBP 27	16,67 b
UBP 42	66,67 a	UBP 28	16,67 b
UBP 43	66,67 a	UBK 11	0 b
UBP 48	66,67 a	UBK 14	0 b
UBP 54	66,67 a	UBK 16	0 b
UBK 03	50 b	UBK 18	0 b
UBK 17	50 b	UBK 22	0 b
UBK 23	50 b	UBP 49	0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de confiança.

Tabela 11 – Relação entre diâmetro do coleto/altura (D/H) de mudas de *E. benthamii*, pré-microbiolizadas quando sementes, por propágulos de bactérias, medidas aos 120 dias após semeadura.

Subgrupo 2			
Tratamento	Médias Relação D/H	Tratamento	Médias Relação D/H
UBK 12	0,412147 a	UBK 02	0,121502 b
UBK 01	0,202716 b	UBP 43	0,121169 b
UBP 42	0,181771 b	UBP 41	0,120121 b
UBP 30	0,167198 b	UBP 45	0,119536 b
UBK 06	0,155094 b	UBK 17	0,117907 b
UBK 25	0,152911 b	UBP 54	0,114371 b
UBK 24	0,146054 b	UBP 35	0,114305 b
UBK 08	0,138295 b	UBP 32	0,113269 b
UBK 32	0,13586 b	UBP 33	0,108194 b
UBK 30	0,13266 b	UBK 28	0,107472 b
UBK 27	0,131785 b	UBP 25	0,107364 b
UBK 33	0,128505 b	UBP 48	0,101998 b
UBP 34	0,126865 b	UBP 46	0,100102 b
UBK 31	0,126667 b	UBP 26	0,099334 b
UBP 50	0,123473 b	UBP 40	0,095277 b
UBK 29	0,123046 b		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade de confiança.

No ensaio com o terceiro subgrupo, observou-se apenas o efeito sobre a germinação pelos isolados: UBK 16, UBD 01, UBD 02, UBD 9, UBD 13, UBD 15, UBD 16, UBD 17, UBD 21, UBD 26, UBD 29 e controle, em relação aos demais isolados (Tabela 08 e 09).

Tabela 12 – Efeito dos isolados bacterianos no ensaio realizado com o subgrupo 3 no ensaio de seleção massal, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD)

Subgrupo 3	FV	Fcalc.
	Germinação	2.2147 *
	Altura (H)	0.666 ^{ns}
	Número de Folhas (NF)	1.939 ^{ns}
	Diâmetro de coleto (Dc)	0.670 ^{ns}
	Comprimento de Raiz (CR)	1.769 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Aérea (PSA)	0.921 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Radicular (PSR)	0.866 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Total (PST)	0.976 ^{ns}
	Relação PSA/PSR	0.596 ^{ns}
	Relação H/D	0.542 ^{ns}
	Relação D/H	0.556 ^{ns}
	IQD	1.013 ^{ns}

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo a 95% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 13 – Germinação *in vivo* de sementes de *Eucalyptus benthamii* previamente microbiolizadas em suspensão de isolados bacterianos, referentes ao subgrupo 3.

Subgrupo 3			
Tratamento	Germinação (%)	Tratamento	Germinação (%)
ÁGUA	83,33 a	UBD 10	33,33 b
UBD 09	83,33 a	UBK 22	33,33 b
UBD 01	83,33 a	UBK 29	33,33 b
UBD 13	66,67 a	UBD 04	16,67 b
UBD 15	66,67 a	UBD 06	16,67 b
UBD 16	66,67 a	UBD 25	16,67 b
UBD 21	66,67 a	UBK 11	16,67 b
UBD 02	50 a	UBK 14	16,67 b
UBD 17	50 a	UBD 12	0 b
UBD 26	50 a	UBD 30	0 b
UBD 29	50 a	UBK 31	0 b
UBK 16	50 a		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Skott-Knott, a 95% de probabilidade de confiança.

Pelo fato de todas as mudas do tratamento controle terem morrido em todos os subgrupos no ensaio de seleção massal, optou-se por selecionar apenas o isolado que apresentou efeito sobre a relação D/H para avaliação do ensaio de confirmação. Sobre a germinação nenhum isolado foi selecionado, pois nenhum foi melhor que o tratamento controle.

Segundo Carneiro (1995), a relação D/H é considerada um bom parâmetro para avaliar a qualidade de mudas sendo denominado pelo autor como coeficiente de robustez da muda, pois reflete a proporcionalidade entre a base da muda e sua altura, em que quando há desvios resulta em problemas de desenvolvimento como o estiolamento ou subcrescimento. Desse modo, selecionou-se o isolado UBK 12 que se destacou dos demais (Figura 3).

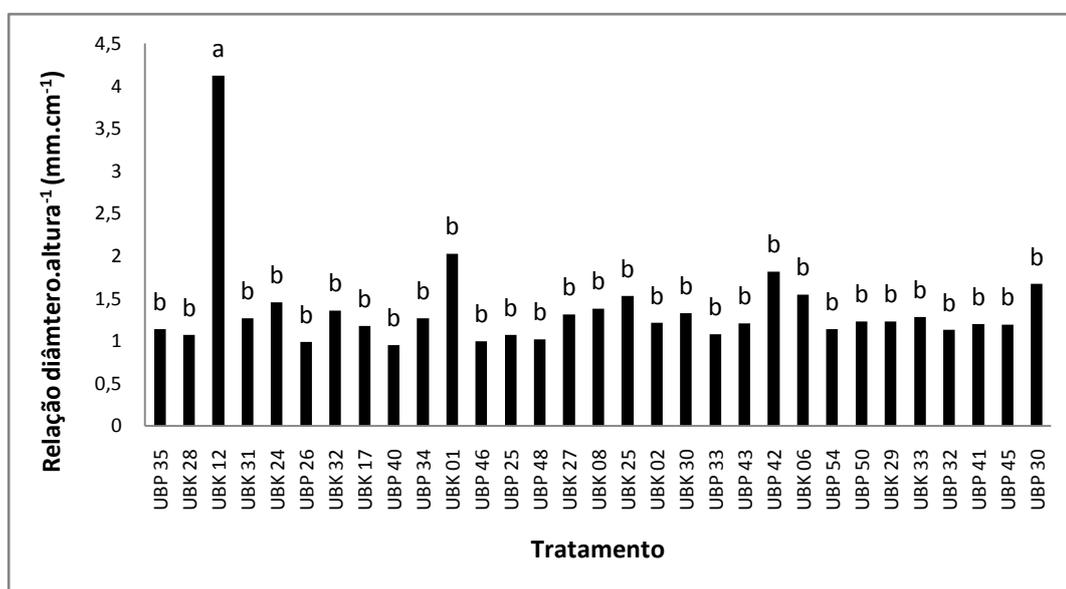


Figura 03 - Efeito de diferentes propágulos de rizobactérias sobre a relação diâmetro do coleto/ altura (D/H). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott–Knott, a 95% de probabilidade de significância. (UBK: *Unicentro-benthamii*-Katia; UBP: *Unicentro-benthamii*-Pinus).

5.4. Ensaio de Confirmação

Não foi observado efeito do isolado bacteriano testado sobre nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 14). Em contrapartida, Mafia et al. (2005, 2007, 2009a) observaram que isolados de rizobactérias foram eficazes em promover o enraizamento e crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus* sp. Todavia, esses estudos não foram realizados com espécies subtropicais, como é o caso do *E. benthamii*. Em contrapartida, alguns isolados testados

novamente, Mafia et al. (2009b), observaram que os isolados de rizobactérias 3918 e S1 não promoveram o enraizamento de mudas clonais de *E. grandis* x *E. urophylla*, quando as estacas das mesmas foram microbiolizadas com propágulos desses isolados; demonstrando assim que há controvérsias e, por vezes, dificuldades na repetibilidade dos resultados.

Tabela 14 – Efeito do isolado UBK 12, no ensaio de confirmação, sobre a germinação, altura (H), número de folhas (NF), diâmetro de coleto (Dc), comprimento de raiz (CR), peso da massa seca aérea (PSA), peso seco da massa radicular (PSR), peso da massa seca total (PT), relação entre peso da massa seca aérea e peso da massa seca radicular (PSA/PSR), relação entre altura/diâmetro (H/D), relação entre diâmetro/altura (D/H) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

Ensaio 3	FV	Tcalc.
	Germinação	0.1626 ^{ns}
	Altura (H)	0.4744 ^{ns}
	Número de Folhas (NF)	0.9074 ^{ns}
	Diâmetro de coleto (Dc)	0.6741 ^{ns}
	Comprimento de Raiz (CR)	1.7749 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Aérea (PSA)	0.7724 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Radicular (PSR)	1.4488 ^{ns}
	Peso da Massa Seca Total (PST)	1.2210 ^{ns}
	Relação PSA/PSR	0.7599 ^{ns}
	Relação H/D	0.1428 ^{ns}
	Relação D/H	0.0379 ^{ns}
	IQD	0.6115 ^{ns}

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste T; ^{ns} não significativo a 95% de probabilidade pelo teste T.

Brunetta et al. (2010) estudando o uso de rizobactérias em *Pinus taeda*, observaram isolados capazes de promover o crescimento de mudas da espécie e também isolados que não promoveram o crescimento, mas também não reduziram o desenvolvimento das mudas. Avaliando o efeito do controle da podridão pós-emergência com o uso de rizobactérias, Eneback et al. (1998) observaram que os isolados BS1 e BS3 de *Bacillus subtilis* e o isolado SE56 de *Bacillus sphaericus*, propiciaram o aumento da doença em mudas tratadas com esses propágulos.

Alguns trabalhos têm demonstrado que há uma interação significativa entre o isolado e a procedência vegetal, inferindo-se que o uso de rizobactérias não se restringe somente à capacidade da bactéria ser promotora de crescimento ou agente de biocontrole, mas dessa interação.

Raasch et al. (2012), avaliando o biocontrole de ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) em mudas de dois clones de *E. grandis* x *E. urophylla*, observaram que para o clone 1004 a Área Abaixo da Curva de Progresso de Incidência (AACPI) reduzia quando as estacas eram microbiolizadas com propágulos de rizobactérias. Já para o clone H13, a AACPI era a mesma em relação ao tratamento controle, quando tratado com os mesmos isolados; o que evidencia a capacidade de interação da espécie ou mesmo estirpe de rizobactéria utilizada com a espécie vegetal.

Portanto, pode-se perceber que tanto para biocontrole quanto para a promoção do crescimento, os resultados do uso de rizobactérias na produção de mudas florestais é fato ainda controverso. É possível encontrar efeitos positivos (MAFIA et al., 2005; 2007; 2009a; RAASCH et al., 2012), deletérios (ENEBAK et al., 1998; MAFIA et al., 2009b) e, ou não ter efeito algum, como observado por Brunetta et al. (2010) e o observado no presente trabalho.

Na área florestal, o uso desses micro-organismos é prática incipiente, sendo necessário ainda a prospecção de novos isolados na busca daqueles realmente efetivos e que possam atuar nas condições requisitadas. Seja na propagação seminal ou clonal, é importante identificar aqueles que interajam da melhor forma possível com cada material genético, observando-se a gama de espécies, clones, variedades aos quais esses possam ter o efeito desejável.

6. CONCLUSÕES

Os isolados UBF 02, UBF 03, UBF 04, UBF 05, UBF 06, UBF 07, UBF 08 e UBF 10, provenientes do filoplano de mudas de *Eucalyptus benthamii* foram capazes de colonizar o sistema radicular de mudas da mesma espécie, mas não tiveram efeito sobre a germinação de sementes e na promoção de crescimento.

Rizobactérias isoladas de *E. benthamii* e de *Pinus* sp. colonizaram o sistema radicular de mudas de *E. benthamii*, mas também não tiveram efeito sobre a germinação e a promoção de crescimento de mudas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011**. Editora ABRAF. Brasília, 2012. 150p.
- ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2007. 382p.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G. & ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV. 2009. 500p.
- AMORIM, E. P. da R. & MELO, I. S. de. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Ver. Bras. De Fruticultura**. v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.
- ANDRADE, E. N. **O eucalipto**. 2 ed. Jundiaí, São Paulo, 1961.
- ANN, Y. C. Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. **African Journal of Microbiology Research**. v.06, p. 4185 – 4193, 2012.
- ASLANTAS, R., ÇAKMAKÇI, R. & SAHIN, F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. **Scientia Horticulturae**. V. 111, p. 371 – 377, 2007.
- AUSTRALIAN NATIONAL BOTANIC GARDENS. 2011. Disponível em <<http://www.anbg.gov.au/PLANTFAM/AUST1C.HTM>> Acessado em 21 de abril de 2011.
- AYSHA, O. S.; VINOTHKUMAR, P.; VASUKI, S.; VALLI, S.; NIRMALA, P. & REENA, P. *Bacillus* species isolated from tomato plant – A comparative study on coconut water enrichment. **Intenational Journal of Bioassays**. v.01, n. 11, p.131–137, 2012.
- BENSON, D.H. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin, Wallacia. **Cuninghamia**. v.1, n.3, p.371-383, 1985.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP. Meio Ambiente, 2009.

BORGES, A. L.; SILVA, A. L. da; BATISTA, D. da C.; MOREIRA, F. R. B.; FLORI, J. E.; OLIVEIRA, J. E. de M.; ARAÚJO, J. L. P.; PINTO, J. M.; CASTRO, J. M. da C e; MOURA, M. S. B. de; AZOUBEL, P. M.; CUNHA, T. J. F.; SILVA, S. de O. e & CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de produção da bananeira irrigada**. Embrapa Semiárido. Sistema de Produção 4, jul/2009.

BRONDANI, G. E., DUTRA, L. F., GROSSI, F., WENDLING, I. & HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **R. Árvore**. v.33, n.01, p. 11 – 19, 2009.

BROOKER, M. I. H., SLEE, A. V. & DUFFY, S. M. EUCLID: **Eucalypts of Southern Australia**. On line sample. 2 ed. 2002. Disponível em < <http://www.anbg.gov.au/cpbr/cd-keys/Euclid/sample/html/index.htm>> Acessado em: 21 de abril de 2011.

BRUNETTA, J. M. F. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; GOMES, J. M.; BINOTI, D. H. B. & FONSECA, N. A. N. Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de diferentes espécies de *Pinus* sp. **R. Árvore**. v.31, n.06, p. 1027 – 1033, 2007.

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

BUSS, R. B.; CAMPESATO, C. B. A.; CORRÊA, B. O.; CASTILHOS, D. D. & MOURA, A. B. Avaliação da emergência de sementes de feijão microbiolizadas com rizobactérias promotoras de crescimento e rizóbios. **In: Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica e da II Mostra Científica**. Pelotas, RS. 2010.

CAMPINHOS, E.J. & IKEMORY, Y.K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**. v.23, p. 47-52, 1983.

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

CARPENEZZI, A. A.; PEREIRA, J. C. D.; CARVALHO, P. E. R.; REIS, A.; VIEIRA, A. R. R.; ROTTA, E.; STURION, J. A.; RAUEN, M. de J. & SILVEIRA, R. A. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina**. 113 p. (EMBRAPA-CNPQ, documentos, 21). Curitiba, 1988.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S. & GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças da parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.6, p.45-460, 2008.

CHANWAY, C. P.; RADLEY, R. A. & HOLL, F. B. Inoculation of conifer seed with plant growth promoting *Bacillus* strains causes increased seedling emergence and biomass. **Sol. Biol. Biochem.** v. 23, n. 6, p.575-580, 1991.

COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT, C. & BARKA, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Disease: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.09, p.4951 – 4959, 2005.

COUTINHO, J. L. B., SANTOS, V. F. dos, FERREIRA, R. L. C. & NASCIMENTO, J. C. B. Avaliação do comportamento de espécies de *Eucalyptus* spp. na zona da mata pernambucana. I: resultados do primeiro ano – 2001. **R. Árvore**. v.28, n.06, p.771 – 775, 2004.

DÍAZ, K., VALIENT, C., MARTÍNEZ, M., CASTILHO, M. & SANFUENTES, E. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. v.25, p.867 – 873, 2009.

DILANTHA FERNANDO, W. G., NAKKEERAND, S. & ZHANG, Y. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant disease. In: SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: Biocontrol and biofertilization**. Springer, Dordrecht, Holanda. p. 67 – 109, 2005.

DOMENECH, J., RAMOS – SOLANO, B., PROBANZA, A., LUCAS – GARCÍA, J. A., COLÓN, J. J. & GUTIÉRREZ – MEÑERO, F. J. *Bacillus* sp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* spp. ballota: a study on tree growth, rizosphere community structure and mycorrhizal infection. **Forest Ecology and Management**. V.194, p.293 – 303, 2004.

ELDRIDGE, K., DAVIDSON, J. HARWOOD, C. & WYK, G. van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford Science Publications. Oxford, New York. 2001.

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

FERRARI, M. P., GROSSI, F. & WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. 22 p. (Embrapa Florestas, documentos, 94). Colombo, 2004.

FERREIRA, J. T. P., SANTOS, T. M. C., ALBUQUERQUE, L. S., SANTOS, J. V., CARDOSO FILHO, J. A. & RAMALHO NETO, C. E. Isolation and selection of growth-promoting bacteria of the genus *Bacillus* and its effect on two varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **International Research Journal of Microbiology**. v.02, p.70 – 78, 2011.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 27, n. 1, p.61-70, 2003.

GARCIA, F.A.O. & ROMEIRO, R.S. Biocontrole da mancha-angular do feijoeiro por antagonistas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.46, n.12, p.1603-1608. 2011.

GRAÇA, M. E. C., SHIMIZU, J. Y. & TAVARES, F. R. **Capacidade de rebrota e enraizamento de *Eucalyptus benthamii***. Boletim de pesquisa florestal. Colombo, PR. n. 39, p. 135 – 138, 1999.

GRUPO BIO SOJA. **Boletim Agrônômico**. n.06, 2008.

HIGA, R. C. V. & PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Comunicado Técnico. Colombo, PR. 2003.

HIGA, R. C. V. **Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Boletim de Pesquisas Florestais. Colombo, PR. n.38, p. 121 – 123, 1999.

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. **Cartas climáticas do Paraná**. Disponível em <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=863>>, acessado em 28 de novembro de 2012.

KREMER, R. J. & SOUSSI, T. Cyanide Production by Rhizobacteria and Potential for Suppression of Weed Seedling Growth. **Current Microbiology**. New York. v.43, p.182 – 186, 2001.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas – possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado**. Rossdorf: TZ-Verl.-Ges., 1990.

- LINDOW, S. E. & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p.1875-1883. 2003.
- LUCY M, REED E, GLICK BR. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.86, n.1., p.1-25, 2004.
- LUGTENBERG, B. J. J. & DEKKERS, L. C. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**. v.01, p.9 – 13, 1999.
- 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 eucalyptus species. **Revista Árvore**. 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 de clones de eucalipto. **Revista Árvore**. v.33, p.789-797, 2009b.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G. & SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**. v.29, p.843-851, 2005.
- MELO, R. R. de, STANGERLIN, D. M., MÜLLER, M. T., BELTRAME, R., TREVISAN, R., GATTO, D. A., SANTINI, E. J. & HASELEIN, C. R. Evolução do setor florestal brasileiro. **4º Simpósio Latino-americano Sobre Manejo Florestal**. 2008.
- MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. **In: Biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, pp.7-14, 2009.
- NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B. & KLOK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**. v.8, n.1, p.67 – 76, 1998.
- PALUDZYSZYN FILHO, E., TELLES DOS SANTOS, P. E. & FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados pra plantio no Estado do Paraná**. Dados eletrônicos. Colombo: Embrapa Florestas, 2006.
- PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**. v. 39, p. 103-133, 2001.

POLLI, A., NEVES, A. F. das, GALO, F. R., GAZARINI, J., RHODEN, S.A. & PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **R. Saúde e Biologia.** v.07, n.02, p.82 – 89, 2012.

RAASCH, L. D. BONALDO, S. M. & LIVEIRA, A. A. F. Rizolyptus[®] na produção de miniestacas de eucalipto contra *Puccinia psidii*. **Enciclopédia Biosfera.** v.8, p.854-864, 2012.

ROMEIRO, R.S. & GARCIA F.A.O. **Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana.** In: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariuna: Embrapa Meio ambiente. 2009. pp.85-100.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Enfermidades de Plantas - Fundamentos.** Viçosa: Editora UFV. 2007a. 269 p.

SANTOS, P. E. T. dos; BELLOTE, A. F. J.; SILVA, H. D. da; PALUDZYSZYN FILHO, E.; MEDEIROS, A. C. de S. **Produção e Colheita de Sementes de Eucaliptos Subtropicais na Embrapa Florestas.** Comunicado Técnico. Colombo, PR. 2007.

SBS - Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Setor Florestal Brasileiro. 2010.** Acessado em: 12/06/2010. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/estatisticas.htm>.

SILVA, H.S.A., R.S. ROMEIRO & A. MOUNTEER. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology.** v.151, n.1, p.42-46. 2003.

SILVA, L. D. **Melhoramento genético de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage visando a produção de madeira serrada em áreas de ocorrência de geadas severas.** Curitiba: UFPR, 2008. Tese (doutorado) – Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVEIRA, E. B., GOMES, A. M. A., MARIANO, R. L. R. & SILVA NETO, E. B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura brasileira.** v.22, .02, p.217-221, 2004.

SIMÕES, J. W. Problemática da produção de mudas em essências florestais. **IPEF**. v.4, n.3, p.1 – 29, 1987.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de***Cylindrocladium***, mediadas por rizobactérias em clones de** *Eucalyptus* **spp.** Dissertação de mestrado. None isolate was selected with potential to growth promoting to *E. benthamii* seedlings. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

WENDLING, I. & FERRARI, M. P. Sistema de produção de mudas de eucalipto e pinus. **Revista da Madeira**. Ed.:112, abr. 2008.

YANES, M. L.; FUENTE, L. D. L.; ALTIER, N. & ARIAS, A. Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfafa roots in Uruguayan agroecosystems. **Biological Control**. v. 63, p. 287-295, 2012.

ZHANG, H., XIE, X., KIM, M., KORNIEYEV, D. A., HOLADAY, S. & PARÉ, P. W. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **The Plant Journal**. N. 56, 2008.