

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR**

**EFEITO DE FITORREGULADORES E  
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE MUDAS  
CLONAIS DE *Pinus taeda***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**LETICIA MIRANDA**

**IRATI-PR**

**2015**

**LETICIA MIRANDA**

**EFEITO DE FITORREGULADORES E RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE *Pinus taeda***

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

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Fabiana Schmidt Bandeira Peres

Coorientadora

IRATI-PR

2015

Catálogo na Fonte  
Biblioteca da UNICENTRO

M672e	<p>MIRANDA, Leticia.</p> <p>Efeito de fitorreguladores e rizobactérias promotoras de crescimento na produção de mudas clonais de <i>Pinus taeda</i> / Leticia Miranda. – Irati, PR : [s.n], 2015. 44f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Coorientadora: Profª. Drª. Fabiana Schmidt Bandeira Peres</p> <p>Dissertação (mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Florestais. Área de Concentração : Manejo Florestal. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.</p> <p>1. Engenharia Florestal – dissertação. 2. Benzilamino – purina – BAP. 3. PGPR's. 4. Miniestaquia. I. Oliveira, Flávio Augusto de. II. Peres, Fabiana Schmidt Bandeira. III. UNICENTRO. IV. Título.</p> <p>CDD 585.2</p>
-------	---

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

### PARECER

Defesa Nº 85

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 mestranda **Leticia Miranda** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**EFEITO DE FITORREGULADORES E RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE *Pinus taeda***", 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, 28 de agosto de 2015.



*Dr.ª Luciana Magda de Oliveira*  
Universidade do Estado de Santa Catarina  
Primeira Examinadora

*Dr. Rogério Bobrowski*

Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Segundo Examinador



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

*São as nossas escolhas que revelam o  
que realmente somos, muito mais do  
que as nossas qualidades.*

*Alvo Dumbledore*

***A Deus e aos meus amados pais Maria  
de Lourdes Miranda e Pedro Miranda,  
com todo o meu amor.***

***Dedico!***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida, forças e persistência para alcançar todos os meus sonhos.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus pais amados Maria de Lourdes Miranda e Pedro Miranda, por terem me dado a amor, educação, por terem formado a pessoa que sou e acima de tudo por terem sempre sonhado comigo e me apoiado em cada uma de minhas escolhas.

As minhas amadas irmãs Fabrícia e Renata, que mesmo longe sempre me deram nunca me deixaram faltar forças, conselhos e muito carinho, o que foi meu suporte nos momentos mais difíceis.

Ao professor Flávio Augusto de Oliveira Garcia, pela orientação, conselhos e pela amizade adquirida nesse tempo de convivência.

A professora Fabiana Schmidt Bandeira Peres, pela coorientação, amizade e toda a ajuda prestada na realização deste trabalho.

A minha querida amiga e rommy Bruna, obrigada por ter compartilhado comigo o dia a dia durante todo este período, pelas conversas, jantãs, caminhadas, e por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor.

As minhas amigas mais legais, Paula, Ana, Ludmila, Vanessa e Dyandra que me acolheram de braços abertos e que formaram minha família em Irati. Obrigada pelos almoços, conversas, compras, risadas, festas e principalmente pelo chimarrão de cada dia!

Aos meus colegas de laboratório, Giovanna, Alexandre, Fernanda, Renan e Luis Gustavo e a todos os outros que não estão aqui citados. Obrigada por toda a ajuda, incentivo e amizade.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA TABELAS .....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT .....	VI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITEERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1. <i>Pinus taeda</i> .....	4
3.2. Propagação vegetativa.....	5
3.2.1. Métodos de propagação vegetativa de pinus .....	6
<b>3.3. Reguladores de Crescimento .....</b>	<b>10</b>
3.3.1. Citocininas .....	10
<b>3.4. Microrganismos como agentes promotores de crescimento em plantas.....</b>	<b>11</b>
3.4.1. Rizobactérias.....	12
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Isolamento, Cultivo e Seleção de Rizobactérias Promotoras de Crescimento .....</b>	<b>15</b>
4.1.1. Isolamento das Rizobactérias.....	15
4.1.2. Preparo da Suspensão Bacteriana .....	16
4.1.3. Seleção Massal de Isolados.....	17
4.1.4. Avaliação dos Três Melhores Isolados .....	17
<b>4.2. Uso de Fitorreguladore e Rizobactérias na Miniestaquia de <i>P. taeda</i> .....</b>	<b>19</b>
4.2.1. Descrição do Local .....	19
4.2.2. Estabelecimento, Condução e avaliação do Minijardim Clonal .....	20
4.2.3. Coleta e Preparo de Miniestacas e Aplicação de Rizobactérias .....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Avaliação dos Isolados Bacterianos .....</b>	<b>23</b>
5.1.1. Seleção Massal dos Isolados.....	23
5.1.2. Avaliação dos melhores isolados.....	26
<b>5.2. Produção de brotações em minijardim clonal sob diferentes concentrações de fitorregulador.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3. Efeito do regulador de crescimento e das rizobactérias no enraizamento das</b>	

miniestacas e qualidade de mudas de <i>P. taeda</i> .....	31
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## LISTA TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) de sementes e plântulas de <i>P.taeda</i> em relação aos tratamentos avaliados na primeira e segunda etapa do experimento de seleção massal de isolados bacterianos aos 30 dias de semeadura. ....	23
<b>Tabela 2</b> - Média da porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) do primeira etapa do experimento de germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>P.taeda</i> aos 30 dias de semeadura.....	24
<b>Tabela 3</b> - Média da porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) da segunda etapa do experimento de germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>P.taeda</i> aos 30 dias de semeadura.....	25
<b>Tabela 4</b> - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER), altura (ALT), comprimento de raiz (CR) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes e plântulas de <i>P.taeda</i> em relação aos tratamentos aplicados <i>in vitro</i> , avaliados aos 30 dias de semeadura.....	27
<b>Tabela 5</b> – Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de <i>P.taeda</i> , submetidas a formas de aplicação e isolados de rizobactérias, para o experimento <i>in vitro</i> , avaliados aos 30 dias de inoculação das sementes no meio. ....	28
<b>Tabela 6</b> - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes e plântulas de <i>P.taeda</i> em relação aos tratamentos aplicados <i>ex-vitro</i> , avaliados aos 30 dias de semeadura. ....	29
<b>Tabela 7</b> – Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) para os tratamentos aplicados <i>ex-vitro</i> , avaliados aos 30 dias de semeadura.....	29
<b>Tabela 8</b> - Análise de variância para a número de brotações produzidas por minicepa sob a aplicação de diferentes doses do regulador de crescimento BAP, aos 30, 90, 150 e 225 dias após a aplicação do regulador (DAPR).....	31
<b>Tabela -9</b> – Análise de variância para enraizamento (ENR), comprimento de raízes formadas em (cm) (CR), diâmetro do colo das mudas formadas (mm) (DIAM), altura da	

parte aérea das mudas formadas (cm) (ALT), índice de qualidade de Dickson (IQD) massa seca de raízes em gramas (MSRA), massa seca de parte área em gramas (MSPA) em mudas de *P. taeda*, formadas a partir da aplicação de diferentes doses do regulador de crescimento BAP, e dois isolados bacterianos em duas coletas. ....33

**Tabela 10** – Diâmetro do colo de miniestacas de *P. taeda*, provenientes de minicepas tratadas com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP. ....34

**Tabela 11** – Diâmetro do colo de miniestacas de *P. taeda*, imersas em suspensões de isolados bacterianos. ....34

**Tabela 12** – Altura de miniestacas de *P. taeda*, provenientes de minicepas tratadas com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP.....34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do processo de isolamento de rizobactérias utilizando alíquotas de solo e raízes. .... 15
- Figura 2** – Esquema representativo do processo de diluição seriada e dispensão das diluições em placas de petri no processo de isolamento de rizobactérias. .... 16
- Figura 3** – Miniestaquia e aplicação de rizobactérias em mudas de *P. taeda*. Fases de montagem do ensaio de produção de mudas. (A) brotação de *P. taeda* em tamanho ideal de coleta; (B) imersão das miniestacas na suspensão bacteriana; (C) estaqueamento; (D) miniestacas de *P. taeda* mantidas em casa de vegetação. .... 21

## RESUMO

Leticia Miranda. **Efeito de fitorreguladores e rizobactérias promotoras de crescimento na produção de mudas clonais de *Pinus taeda* L.**

Neste trabalho foram estudados os efeitos de aplicações de diferentes dosagens de benzilaminopurina (BAP) em minicepas e a influencia do uso de rizobactérias no enraizamento de miniestacas de *P. taeda*, bem como a seleção massal desses isolados na germinação de sementes *in vitro* e *ex vitro*. Realizou-se a seleção massal de 128 isolados bacterianos de solos de plantios de *P. taeda* em diferentes locais. A seleção massal das bactérias foi realizada via germinação *in vitro* em meio ágar-água de sementes de *P. taeda* microbiolizadas com as bactérias. O trabalho foi dividido em duas etapas, testando-se 73 e 55 isolados por etapa respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 12 repetições por tratamento. Avaliou-se ao final de 30 dias a porcentagem final de germinação, altura das plântulas e comprimento de raízes. Em seguida, foi realizado um teste de confirmação, onde os três melhores isolados bacterianos foram submetidos a dois ensaios de germinação de sementes de *P. taeda* *in vitro* e *ex vitro*, respectivamente, em diferentes formas de aplicação da suspensão bacteriana nas duas condições. Utilizou-se o delineamento experimental DIC em esquema fatorial com 10 repetições por tratamento. Ao final de 90 dias *ex vitro* avaliou-se a germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG). No ensaio *in vitro*, ao final de 30 dias, avaliou-se a germinação, altura de plântula e comprimento de raízes. O BAP foi aplicado no minijardim em quatro diferentes dosagens 0,0, 0,5, 2,5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso (DBC), com quatro repetições e 12 plantas por bloco por tratamento. Avaliaram-se a produção médias de brotações aos 30, 90, 150 e 225 dias. Realizou-se ainda um experimento com duas coletas de miniestacas, as quais tiveram suas bases imersas em suspensão bacteriana de dois isolados com posterior estaqueamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial quatro doses de BAP x dois isolados, com 10 repetições por tratamento. Aos 90 dias avaliou-se o percentual de enraizamento das miniestacas, altura e diâmetro do colo, comprimento da maior raiz, massa seca de raízes e parte aérea e IQD. O experimento de seleção massal apresentou diferenças significativas para as variáveis altura e

comprimento de raiz nas duas etapas, e porcentagem de germinação na segunda etapa. No experimento de confirmação dos três melhores isolados *in vitro*, houve diferença na forma de aplicação do isolado para o IVG, onde a aplicação da suspensão bacteriana no meio ágar/água 10 dias após a inoculação da semente foi a melhor forma de aplicação, e o isolado 25D a melhor bactéria. No experimento *ex vitro* houve diferença para o isolado, também no parâmetro IVG, onde o 25D foi novamente superior aos demais tratamentos. No experimento de aplicação do fitorregulador em minijardim de *P. taeda* as doses de BAP não influenciaram a produção de brotações. No experimento de enraizamento de miniestacas, na primeira coleta, para o diâmetro do colo, a dose 10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e os dois isolados bacterianos, foram os melhores tratamentos.

**Palavras-chave:** Miniestaquia; BAP; PGPR's.

## ABSTRACT

Leticia Miranda. **Phytohormones and promoting rhizobacteria growth effect in the production of clonal seedlings of *Pinus taeda* L.**

The effects of application of different BAP dosages in miniclone garden and the influence of the use of rhizobacteria on rooting of cuttings of *P. taeda*, as well as the mass selection of these isolated on seed germination *in vitro* and *ex vitro* were studied in this work. There was the mass selection of 128 bacterial isolates from soils of *P. taeda* plantations in different locations. The mass selection of bacteria was conducted *in vitro* by germination of *P. taeda* seeds microbiolized with bacteria in agar-water. The test was divided into two stages and tested 73 and 55 isolates respectively by step. The experimental design was DIC with 12 repetitions per treatment. Was evaluated at the end of 30 days the final germination percentage, seedling height and root length. Next, we performed a confirmatory test, where the top three bacterial isolates were subjected to two seed of *P. taeda* germination test, *in vitro* and *ex vitro* respectively, and tested different application forms of the bacterial suspension on both conditions. Was used the experimental design DIC in a factorial design with 10 replications. At the end of 90 days, *ex vitro*, was evaluated the germination and IVG. In the *in vitro* test, at the end of 30 days it was evaluate germination, seedling height and root length. BAP minigarden was applied at four different doses 0.0, 0.5, 2.5 and 10 mg.L<sup>-1</sup>. The design was DBC, with four replications and 12 plants per block per treatment. The means of production shoots at 30, 90, 150 and 225 days were evaluated. It was performed still an experiment with two collections of cuttings, they had their bases immersed in bacterial suspension of two isolates before planted. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement of four doses of BAP x two bacterias with 10 repetitions per treatment. After 90 days was evaluated the percentage of rooting, height and stem diameter, the largest root length, dry mass of roots and shoots part and IQD. The mass selection experiment showed significant differences for the variables height and root length in two stages, and germination percentage in the second stage. In the experiment for confirmation of the three best isolates *in vitro* there was difference in the application form and isolated for IVG, where the application of the bacterial suspension in agar / water 10 days after seed inoculation was the best form of application, and 25D the best bacteria. In the experiment *ex vitro* there was difference for the isolated, also in IVG

parameter, where the 25D was again superior to other treatments. In phytohormone application experiment in *P. taeda* miniclone garden doses of BAP did not influence the production of shoots. In cuttings rooting experiment, in the first collection, for the stem diameter the dose 10 mg L<sup>-1</sup> BAP and the two bacterial isolates were the best treatments. The height suffered influence of the BAP, but no treatment was superior to witness. In the second collection there were no significant differences for any of the parameters.

**Key-words:** minicuttings; BAP; PGPR's.

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade florestal é um importante segmento da economia brasileira, representando aproximadamente 31% do saldo total da balança comercial nacional (IBÁ, 2014). A silvicultura é um importante componente da atividade florestal e os cultivos de *Pinus taeda* L. são um dos destaques do setor. Tanto pela alta produtividade quanto pela qualidade da madeira, o que a torna uma das principais matérias primas tanto na indústria madeireira quanto na indústria de celulose e papel (SCHULTZ, 1997).

Mesmo após ter sofrido um decréscimo de área plantada em solos brasileiros nos últimos anos, *Pinus* spp. ocupa 1,57 milhões de hectares plantados, ficando atrás apenas dos cultivos de *Eucalyptus* spp. Cerca de 87% da área cultivada com pinus concentra-se na região sul do Brasil, onde as condições edafoclimáticas favorecem o desenvolvimento, tornando o plantio destas espécies, em especial *P. taeda* atividade de extrema importância econômica (IBÁ, 2014).

O Brasil encontra-se entre os principais produtores de matéria prima de base florestal do mundo, devido a fatores como clima e solo, mas principalmente pela qualidade de suas florestas, característica alcançada graças ao melhoramento genético e as práticas silviculturais adotadas. Isto levou a florestas produtivas com ciclo reduzido quando comparado a outros países.

A técnica de clonagem é uma ferramenta fundamental do melhoramento genético de plantas. Foi introduzida no Brasil como estratégia de propagação de árvores resistentes ao cancro-do-eucalipto (*Chrysosporthe cubensis*) em florestas de *Eucalyptus* spp. Devido aos avanços proporcionados com a possibilidade de exploração de características de baixa herdabilidade, aliada à homogeneidade de plantios tornou-se ferramenta imprescindível para o melhoramento florestal e alavancou a silvicultura clonal (XAVIER e SILVA, 2010).

Ao contrário da maioria das espécies de *Eucalyptus*, *Pinus* spp. são consideradas recalcitrantes a propagação clonal por enraizamento de miniestacas, principal técnica utilizada para produção de mudas clonais em larga escala. Mesmo apresentando uma porcentagem de enraizamento aceitável para alguns materiais genéticos, de maneira geral a produção de mudas clonais destas espécies ainda é considerada economicamente inviável (ALFENAS et al., 2009; XAVIER e SILVA, 2010;).

Neste cenário, o desenvolvimento da silvicultura clonal para *P. taeda* representa

atualmente, uma prioridade de pesquisa do setor florestal da região sul do Brasil (AMERSON *et al.*, 1985). As dificuldades na propagação clonal de *P. taeda* são inerentes aos fatores endógenos e exógenos, fatores os quais podem influenciar a técnica, que devido sua importância devem ser melhores investigados (HAMANN, 1998).

Sabe-se que alguns microrganismos possuem efeito benéfico sobre o desenvolvimento de materiais vegetais, atuando muitas vezes em uma relação simbiótica, ou em outros casos, apenas na proteção do tecido vegetal. Microrganismos rizosféricos já foram descritos como indutores de hormônios, como auxinas, que são essenciais para o processo de enraizamento adventício (ASHAD; FRANKENGERGER, 1993; AHAMAD *et al.*, 2008). Deste modo estes microrganismos podem promover melhorias no processo de clonagem de espécies recalcitrantes, como *P. taeda*.

Outro desafio apresentado na produção clonal de *P. taeda* é a baixa produção de brotações por minicepa, portanto, o uso de reguladores de crescimento, em especial do grupo das citocininas, que induzam o material vegetal a produzir brotações pode tornar-se uma boa alternativa. O 6-benzilaminopurina (BAP) tem apresentado resultados promissores quando utilizado para a multiplicação da parte aérea e produção de gemas adventícias em diversas espécies florestais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Portanto, para *P. taeda*, faz-se necessária a investigação de fatores como o uso microrganismos promotores de crescimento e fitorreguladores, na tentativa de amenizar ou solucionar as dificuldades das técnicas de miniestaquia e tornar possível a produção de mudas clonais desta espécie de forma economicamente viável.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de um regulador de crescimento e de isolados de rizobactérias na miniestaquia de *Pinus taeda*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar e selecionar rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de *P. taeda*.
- Testar o efeito de rizobactérias no enraizamento adventício de miniestacas de *P. taeda*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP na produção de brotações em minicepas de *P. taeda*, bem como a influência sobre o enraizamento dessas brotações.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Pinus taeda*

Espécies do gênero *Pinus* são classificadas no reino Plantae, na divisão Pinophyta, classe Pinopsida, ordem Pinales e família Pinaceae. São originárias das planícies adjacentes do golfo do México e costa atlântica dos Estados Unidos. Representam hoje as mais importantes espécies presentes nas florestas da Europa, EUA e Canadá. Em sua região de origem, as principais espécies presentes são *P. taeda*, *P. elliottii* Engelm e *P. patula* (MARCHIORI, 2005).

O Brasil tem a segunda maior cobertura florestal do mundo, com cerca de 526,5 milhões de hectares, dos quais 7,6 milhões são florestas plantadas com *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., que dividem-se, respectivamente, em 25,2 e 74,8% deste total. Sabe-se ainda, que *P. taeda* ocupa a maior área cultivada no sul-sudeste do Brasil dentre as espécies de *Pinus*, e está presente em 11 estados brasileiros. Grande parte do sucesso dos plantios dessas espécies ocorre devida a alta produtividade e a qualidade da sua madeira, amplamente utilizada nas regiões produtoras em indústrias de painéis de fibra, laminadoras, serrarias, celulose e papel (ABRAF, 2012).

Nas décadas de 1960 e 1970, o Brasil passou por uma fase de grande incentivo aos plantios florestais. No cenário atual, o comércio de produtos de base florestal, especialmente os oriundos de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., exercem forte participação na economia brasileira. Devido às condições edafoclimáticas da região sul do Brasil, *P. elliottii*. e *P. taeda* tiveram uma maior adaptabilidade o que estimulou o cultivo de *Pinus* spp. no sul do Brasil e que atualmente é parte fundamental da economia da região, aumentando consideravelmente o uso de sua madeira da década de 1980 (VASQUES *et al.*, 2007).

No que tange a produtividade dos plantios de *Pinus* spp., que é considerada elevada, muito se deve ao melhoramento florestal que propiciou a seleção e expressão dos melhores materiais genéticos, bem como o manejo que selecionou as condições ambientais mais favoráveis expressando fenótipos altamente produtivos (SHIMIZU, 2008).

O melhoramento é baseado, principalmente, em indivíduos superiores e a partir destes obtêm-se famílias superiores. Essas famílias são obtidas por meio de polinização

controlada, no qual a frequência de indivíduos de alto desempenho em crescimento e qualidade da madeira é geralmente elevada.

Para outras espécies florestais como *Eucalyptus* spp. o processo de melhoramento é auxiliado pelo uso da propagação clonal, que permite a produção em larga escala de indivíduos superiores e mitiga a segregação obtida pela propagação via sementes. Para *Pinus* spp. esse processo é dificultado pela recalcitrância rizogênica, fazendo com que a exploração comercial da clonagem desta espécie seja dificultada pela falta de metodologia que promovam o rejuvenescimento, e conseqüentemente sua competência rizogênica. (ALFENAS *et al.*, 2004).

Segundo Assis (2001), *P. elliottii* e *P. taeda* chegam a apresentar 85% e 76% de enraizamento respectivamente quando derivados de material rejuvenescido, porém, estas espécies são restritas a poucos métodos de resgate e rejuvenescimento da árvore adulta, sendo seu melhoramento baseado apenas em técnicas seminais, o que reduz os ganhos e a velocidade do processo.

### **3.2. Propagação vegetativa**

A propagação vegetativa é a multiplicação de plantas a partir de propágulos vegetativos, de forma a manter as características da planta matriz pela aplicação de princípios e conceitos biológicos de multiplicação vegetal (HARTMANN *et al.*, 1997).

No método tradicional de propagação, o propágulo é uma semente oriunda da junção dos gametas masculino e feminino, podendo ser do mesmo indivíduo ou de indivíduos distintos, e há segregação genética, pelo processo de meiose. Esse evento implica na possibilidade de não ocorrer herança das características desejáveis. A baixa herdabilidade pode ser assim entendida como o quociente entre a variância genotípica e a variância fenotípica, indicando que o fenótipo observado é muito diferente do fenótipo esperado. Por outro lado, na propagação vegetativa todas as características genéticas de um determinado indivíduo são repassadas às plantas subsequentes. Neste caso a única variação que pode ocorrer é de caráter ambiental, implicando em alta herdabilidade, uma vez que o quociente da variância genotípica e variância fenotípica aproxima-se de 1, indicando que a frequência do fenótipo observado é próxima a do esperado (HARTMANN *et al.*, 1997; HIGASHI *et al.*, 2000).

A capacidade de formar um indivíduo idêntico a partir de um propágulo vegetativo só é possível devido a uma característica celular denominada de totipotência, que consiste na capacidade que uma dada célula vegetal possui de sofrer o processo de desdiferenciação e assim assumir funções de células meristemáticas. Estas células totipotentes possuem inclusive a capacidade de realizar a divisão mitótica, diferenciando-se em um novo tecido (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Existem diversas técnicas de propagação vegetativa utilizadas atualmente, dentre elas as de maior destaque são a estaquia, a enxertia, a alporquia, a mergulhia e as técnicas de micropropagação (XAVIER *et al.*, 2013).

### **3.2.1. Métodos de propagação vegetativa de pinus**

#### 3.2.1.1. Propagação *in vitro*

Dentre as principais técnicas na cultura de tecidos pode-se citar a micropropagação, a cultura de embriões, a polinização *in vitro*, a cultura de protoplastos e a microenxertia (XAVIER *et al.*, 2013). Para *P. taeda*, a micropropagação realiza-se pelas técnicas de organogênese, gemas axilares e embriogênese somática (AMERSON *et al.*, 1988).

Para materiais genéticos superiores, preferencialmente obtidos por polinização controlada, a embriogênese somática tem se mostrado uma alternativa promissora na clonagem de *Pinus* spp. A técnica consiste basicamente no uso de embriões imaturos colhidos de cones em desenvolvimento que são induzidos a formar calos em culturas *in vitro*, para passar por um processo de multiplicação de embriões que serão usados posteriormente para obtenção de novas plantas (ALFENAS *et al.*, 2009).

A técnica de propagação pela proliferação de gemas axilares baseia-se no cultivo em meio de cultura, acrescidos de reguladores de crescimento utilizando órgãos meristemáticos como gemas axilares ou meristemas apicais, os quais são induzidos a formar novas partes aéreas a partir das quais se repete o procedimento, subdividindo os tufo de parte aéreas formados em conjuntos menores, dando origem a novos explantes (XAVIER *et al.*, 2013).

Já a organogênese é a produção de eixos caulinares monopolares a partir de gemas pré-existentes, os quais são induzidos ao enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*

visando obter plântulas completas. Essa técnica pode ser direta, quando o eixo caulinar é formado a partir de gemas apicais, laterais ou auxiliares, vindas de explantes primários, ou indireta, quando ocorre a desdiferenciação dos explantes e formação de massas celulares não diferenciadas, originando meristemóides (THORPE, 1980, citado por GUERRA *et al.*, 2006).

#### 3.2.1.2. Estaquia e Miniestaquia

A técnica de formação de mudas a partir do enraizamento de um segmento de caule, raiz ou folha é denominada estaquia, a qual se constitui numa das principais técnicas de propagação vegetativa, pois possibilita a multiplicação clonal de material selecionado geneticamente, de forma operacional e de maneira competitiva quando comparada aos custos das demais técnicas de propagação assexuada (XAVIER *et al.*, 2013).

A miniestaquia nada mais é que uma modificação metodológica da técnica de estaquia, em que faz-se a redução do tamanho das cepas e estacas. Estas adaptações trouxeram um aprimoramento às características de enraizamento e qualidade da muda clonal produzida (ALFENAS *et al.*, 2004). Atualmente é o principal método utilizado para propagação de algumas espécies, tendo sido desenvolvida inicialmente para *Eucalyptus* spp. (ASSIS, 2001).

Na técnica de miniestaquia os propágulos denominados miniestacas, são coletados de ápices caulinares, partir de uma muda clonal ou seminal e estaqueada em condições favoráveis a fim de formar uma nova planta. A base da muda irá emitir novas brotações para futuras coletas formando assim uma minicepa, e o conjunto destas formam um minijardim clonal (ANDREJOW, 2006).

Hartmann *et al.* (1997) relatam que o desenvolvimento de um sistema de clonagem de *P. taeda* ainda depende do entendimento de fatores como a interação do genótipo, idade e manejo da planta matriz, manejo das miniestacas e controle das condições ambientais durante o processo de enraizamento.

O processo de formação de raízes adventícias, ou seja, aquelas raízes que não se originam do embrião sendo obtidas a partir de caules, folhas ou mesmo de porções de raízes já existentes, é uma interação complexa entre fatores endógenos e exógenos, que ainda não estão completamente esclarecidos (SOUZA e PEREIRA 2007). É um

processo no qual células vegetais totipotentes passam por um processo de desdiferenciação celular a fim de formar um novo sistema radicular (XAVIER *et al.*, 2013).

Hartmann *et al.* (1997) citam que o processo de enraizamento pode ser dividido em quatro fases: 1 – desdiferenciação, ou iniciação de um novo ponto meristemático de crescimento a partir de células diferenciadas; 2- formação das raízes iniciais, em que raízes ainda não perceptíveis são formadas; 3 – desenvolvimento de raízes reconhecíveis, onde as raízes iniciais se desenvolvem tornando-se perceptíveis; 4 – crescimento e emergência radicular, culminando na formação de raízes em número suficiente para sustentar a nova planta.

A formação de raízes adventícias a partir de uma miniestaca envolve diversas atividades metabólicas e é influenciada por fatores endógenos e exógenos. Endogenamente, entre os diversos compostos envolvidos no processo rizogênico estão as peroxidases, compostos fenólicos, carboidratos e relações hormonais internas. Exogenamente, o entendimento de fatores como genótipo, condições nutricionais e fisiológicas da planta, substrato para enraizamento, armazenamento e sanidade de miniestacas, aplicação de fitorreguladores e condições ambientais, principalmente luz, umidade e temperatura é de fundamental importância para o sucesso do processo de enraizamento. (XAVIER *et al.*, 2013; HARTMANN, *et al.*, 1997).

O enraizamento de miniestacas de *P. taeda* colhidas a partir de minijardim clonal é influenciado pela idade da planta que deu origem à minicepa. Quanto maior a juvenilidade do material formador da miniestaca, maior seu potencial rizogênico, chegando a apresentar 70% de diferença na porcentagem de enraizamento entre miniestacas colhidas de minicepas formadas a partir de mudas de 60 e 120 dias (ALCANTARA *et al.*, 2007).

As variações fisiológicas que ocorrem na planta matriz durante as diferentes estações do ano também podem exercer grande influência no enraizamento adventício, de forma que as épocas do ano e as condições ambientais específicas para o enraizamento de miniestacas devem ser determinadas para cada espécie (XAVIER *et al.*, 2013). Assim a associação da juvenilidade das minicepas com a época de coleta de brotações é fator indispensável para o sucesso da produção clonal de *P. taeda* (ALCANTARA *et al.*, 2007).

Durante o desenvolvimento de uma planta arbórea esta sofrerá mudanças que influenciam no seu habito de crescimento. Estas mudanças podem ser morfológicas e fisiológicas, como por exemplo, mudança de filotaxia, forma da folha, anatomia do caule, capacidade de enraizamento ou de florescimento, entre outras (GONÇALVES, 1982). Portanto, dependendo de qual parte da planta o propágulo vegetativo for retirado este irá apresentar diferentes graus de juvenilidade ou maturação (HARTMANN *et al.*, 1997).

A eficiência no processo de clonagem pode ser otimizada quando ocorre o correto entendimento do processo de troca da fase juvenil para adulta nas diferentes espécies florestais (WENDLING e XAVIER, 2001). Porém este processo ainda não está completamente elucidado (HACKETT, 1987 citado por WENDLING e XAVIER, 2001). Este grau de juvenilidade está relacionado à idade da planta, que se dividem em idade cronológica, idade fisiológica e idade ontogenética (WENDLING e XAVIER, 2001).

A idade da planta em anos, chamada idade cronológica refere-se ao tempo decorrido desde a germinação da semente até o presente momento. Já a chamada “maturação” está relacionada com a idade ontogenética de uma planta, ou seja, a passagem pelas sucessivas fases do desenvolvimento, isto é, desde a embriogênese até a senescência. A idade fisiológica por outro lado refere-se a aspectos como a perda de vigor, susceptibilidade da planta às condições adversas ou a deterioração (FONTANIER e JONKERS, 1976).

A perda da capacidade de enraizamento de miniestacas caulinares de plantas lenhosas tem sido uma das principais consequências negativas do envelhecimento ontogenético ou maturação (HACKETT, 1987a; ELDRIDGE *et al.*, 1994, citados por WENDLING e XAVIER, 2001). Existem estudos que demonstram a perda da capacidade de enraizamento em estacas caulinares devido ao envelhecimento ontogênico ou maturação. Assim a influência da idade ontogênica da planta matriz pode ser decisiva para o enraizamento das brotações; sobretudo para espécies recalcitrantes como *P. taeda*. (WENDLING e XAVIER, 2001).

### 3.3. Reguladores de Crescimento

Em todos os vegetais ocorre a produção de moléculas que funcionam como eliciadoras de alguns processos metabólicos, e apesar de serem produzidas em concentrações muito pequenas, elas são as responsáveis por grandes efeitos no desenvolvimento das plantas, essas moléculas foram denominadas hormônios vegetais. Estes se dividem em cinco categorias auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico os quais tem por função controlar o desenvolvimento em todas as fases da vida do vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Importante na propagação vegetativa, as auxinas são os principais responsáveis pelo enraizamento adventício de miniestacas de diversas espécies. Dentre as auxinas, o principal regulador de crescimento utilizado é o Ácido Indol Butirico - AIB. O AIB tem apresentado resultados efetivos quanto ao enraizamento de miniestacas, principalmente de espécies de *Eucalyptus* (LANA *et al.*, 2008).

No entanto, trabalhos anteriores mostram que quando aplicado em miniestacas de *P. taeda* o AIB pode ter efeito inibitório ao enraizamento de miniestacas, provavelmente porque a dificuldade de enraizamento não se dá pela deficiência de auxinas endógena, mas por algum outro processo na síntese deste hormônio (ALCANTARA *et al.*, 2008).

#### 3.3.1. Citocininas

As citocininas abrangem uma das principais classes de hormônios. Apesar de ocorrerem como moléculas livres nas plantas, as raízes são tidas como os locais de maior ocorrência da biossíntese natural destes compostos (GEORGE, 1993).

As citocininas têm como principal função estimular a divisão celular, mas também são responsáveis por outros processos fisiológicos das plantas, como a senescência foliar, a mobilização de nutrientes, a formação da atividade dos meristemas apicais, a dominância apical, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes e a superação da dormência das gemas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Os tecidos jovens de embriões e ápices radiculares são as principais regiões que sintetizam este hormônio, os quais são translocados livremente por toda a planta através do xilema (GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1998).

Dentre as citocininas sintéticas, o BAP tem se mostrado uma fonte de citocinina muito eficaz para a multiplicação da parte aérea das plantas, bem como na indução da formação de gemas adventícias (GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1998). Muito utilizado na propagação *in vitro* é a citocinina que apresenta melhores resultados para formação de propágulos vegetativos quando comparadas a outras substâncias.

Morales *et al.* (1999) mostraram que o BAP propiciou a maior formação de calos vegetativos *in vitro* na cultura da macieira quando comparado ao Thydiazuron (TDZ). Em um ensaio de morfogênese *in vitro* da mandioqueira, observou maior efeito na rizogênese nos tratamentos com BAP em comparação a auxina Ácido Naftalenoacético (ANA) (LIMA *et al.*, 2002). O BAP se mostrou efetivo ainda quando comparado a outros fitorreguladores na propagação *in vitro* de pimenta do reino (MOURA *et al.*, 2008).

Em espécies florestais, apesar de ainda não haver trabalhos com utilização desta citocininas em escala de minijardim, para a multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*, observou-se que a concentração de 1,0Mm de BAP em relação a outras concentrações deste fitorregulador e todos os tratamentos com TDZ proporcionaram aumento nas brotações, demonstrando assim a superioridade deste composto também para espécies lenhosas (GRAÇA *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados para pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Lattuada, 2010), para figueira (BRUM *et al.*, 2002), acácia-negra (BORGES *et al.*, 2004), *E. grandis* e *E. urophylla* (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

### **3.4. Microrganismos como agentes promotores de crescimento em plantas**

Entre os anos de 1895 e 1909 foram feitos os primeiros estudos utilizando microrganismos como promotores do crescimento de plantas, realizados na antiga União Soviética, utilizando *Bacillus* spp. e *Azotobacter chroococcum* (MISHUSTIN; NAUMOVA, 1963).

Atualmente, sabe-se que é numerosa a quantidade de microrganismos com efeitos benéficos ao desenvolvimento das plantas, dentre estes, as bactérias de vida livre. Segundo Kloepper *et al.* (1989), os primeiros estudos envolvendo estes microrganismos mostraram que algumas espécies de bactérias quando aplicadas a sementes ou raízes estimulavam o crescimento e desenvolvimento das plantas,

facilitando a penetração das raízes no solo durante a germinação de sementes ou influenciando a simbiose entre outros microrganismos com a planta.

Em qualquer habitat capaz de sustentar vida, os microrganismos podem ser encontrados, porém de todos os habitats é no solo onde ocorre o seu crescimento mais intenso (MADIGAN *et al.*, 2010).

#### 3.4.1. Rizobactérias

O uso de microrganismos como antagonistas e promotores de crescimento em plantas vem sendo praticado empiricamente há muitos séculos, porém, apenas a partir do século XX esta prática teve sua importância reconhecida no meio científico (ROMEIRO, 2007).

Na rizosfera, região do solo que sofre influência do sistema radicular de uma planta, ou rizoplano, tecido externo das raízes, a predominância é de bactérias, as quais se organizam em colônias e vivem em uma relação simbiótica com as raízes.

Segundo Hiltner (1904), citado por Romeiro (2007), os exsudados das plantas liberam no solo uma rica quantidade de compostos assimiláveis, como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, o que torna o solo sem o sistema radicular extremamente pobre do ponto de vista nutricional. Estas bactérias utilizam-se dos exsudados das plantas as quais colonizam e em contrapartida atuam direta ou indiretamente promovendo o crescimento vegetal (ROMEIRO, 2007).

Kloepper *et al.* (1989) definem rizobactérias como toda e qualquer bactéria que habita a rizosfera e é capaz de colonizar as raízes promovendo impactos neutros, benéficos ou maléficos. Kloepper e Schroth (1978) citados por Kloepper e Schroth (1981), definiram o termo *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - PGPR, que pode ser traduzido por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, em que estas além de colonizarem o rizoplano ainda tem capacidade de promover o crescimento de plantas.

As PGPR's podem atuar como biofertilizantes, ao fixarem nitrogênio (N<sub>2</sub>) do ar, como fitoestimulantes quando induzem a planta a produzir hormônios, ou ainda como agentes de controle biológico de doenças, inibindo o desenvolvimento ou colonização de um patógeno (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001). Podem ainda auxiliar no aumento da área do sistema radicular, a disponibilidade de nutrientes na área de solo próxima a raiz (VESSEY, 2003), e inibir a produção de gelo sobre a superfície

das folhas, quando colonizadoras do filoplano, ou ainda a ocorrência de mais de um desses mecanismos em conjunto (BEATTIE e LINDOW, 1999).

Efeitos como antagonismo microbiano que levam ao controle biológico pela supressão do patógeno na planta colonizada por PGPR são considerados mecanismos indiretos de promoção de crescimento de plantas por estes microrganismos (LUCY *et al.*, 2004). Por outro lado pode-se chamar de mecanismos diretos efeitos como a solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, transferência de ferro para a planta pela produção de sideróforos, além de produção e síntese de fitormônios e redução de níveis de etileno, entre outros.

Os maiores estudos envolvendo o potencial benéfico da adição de PGRP estão na área agrícola. As vantagens do uso de rizobactérias incluem benefícios como aumento das taxas de germinação, crescimento de raízes, produção de grãos, área foliar, conteúdo de clorofila, magnésio, nitrogênio, proteínas, atividade hídrica e tolerância à seca. Além disso, as PGPR's são usadas como agentes de controle biológico para reduzir o efeito das doenças nos cultivos agrícolas. (LUCY *et al.*, 2004)

Os benefícios do uso de rizobactérias podem ir além dos ganhos obtidos na qualidade de mudas em viveiro, aumentando também a sobrevivência a campo, e mesmo não se tratando de uma prática comum, o uso das rizobactérias em plantas arbóreas é de grande importância (BRUNETTA, 2006). Além dos benefícios já mencionados, e, devido ao advento da silvicultura clonal e da dificuldade de algumas espécies em se propagar vegetativamente, ampliou-se as pesquisas envolvendo a aplicação de microrganismos para o enraizamento de miniestacas clonais.

Diversos autores tem pesquisado o efeito benéfico de microrganismos no enraizamento adventícios de plantas propagadas vegetativamente. Mafia *et al.* (2007), observaram ganhos de até 70% em incremento no crescimento de mudas de um clone de eucalipto quando tratadas com suspensão de rizobactérias, além de um aumento de até 246% em biomassa radicular em comparação com mudas não inoculadas e até 16% de incremento na taxa de enraizamento de determinados clones. Na sobrevivência de mudas de angico-vermelho produzidas por miniestacas, Dias *et al.* (2012), constataram efeitos de promoção de crescimento em plantas tratadas com micorrizas.

Mafia *et al.* (2005) observaram um incremento quanto a produção de brotações em minicepas de *Eucalyptus spp.* quando inoculadas com rizobactérias. Porém, o ganho adquirido pela minicepa não foi refletido pela miniestaca.

Ainda são escassos os trabalhos que comprovem a eficiência de PGPR's no enraizamento adventício em miniestacas de espécies coníferas. Burns e Schwarz (1996), relatam a ocorrência de efeito de promoção, variando entre 15 e 90% no enraizamento adventício de *P. ellioti in vitro* quando adicionados isolados de PGPR. Este potencial foi inicialmente observado por estes autores, quando notificaram uma relação positiva entre o enraizamento espontâneo de explantes provenientes de recipientes onde havia a contaminação por colônias bacterianas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento, Cultivo e Seleção de Rizobactérias Promotoras de Crescimento

#### 4.1.1. Isolamento das Rizobactérias

Para o isolamento das rizobactérias foram coletados solos e fragmento de raízes da rizosfera de quatro diferentes plantios de *P. taeda*, localizados: no *Campus* da Unicentro Irati-PR (A); no *Campus* da UFPR Curitiba-PR (B); no *Campus* Rothenburg am Neckar-Baden Wüthemberg-Alemanha (C); e no Município de Rebouças-PR (D). O solo foi coletado a uma profundidade variando entre 1 e 10 cm e a uma distancia de até 4,0 cm da raiz da planta, totalizando cerca de 100g de solo por coleta.

Para o início do isolamento tomou-se alíquotas de 10g das amostras de solo rizosférico e de segmentos radiculares pesados em balança analítica. Com o objetivo de extrair as bactérias do solo, as soluções salinas contendo as amostras de solo foram colocadas sob agitação, por 12 horas, a 28° C, em agitador orbital (Figura 1 e 2).

A partir da suspensão obtida, tomou-se uma alíquota de 1 mL, procedendo diluições seriadas no fator de 1:10. Estas primeiras alíquotas pipetadas foram dispensadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85% NaCl) (p/v) esterilizada (Figura 1). Este procedimento foi repetido até a obtenção das dez diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ).

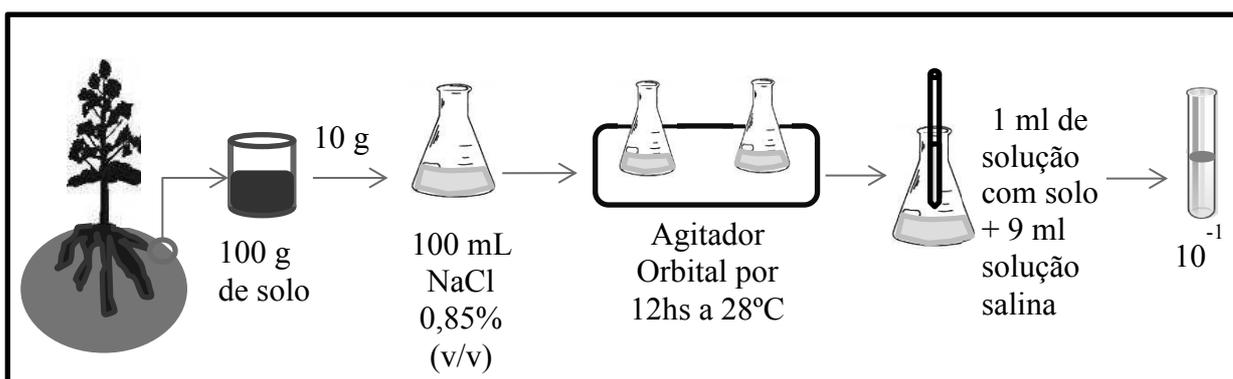


Figura 1 – Esquema representativo do processo de isolamento de rizobactérias utilizando alíquotas de solo e raízes.

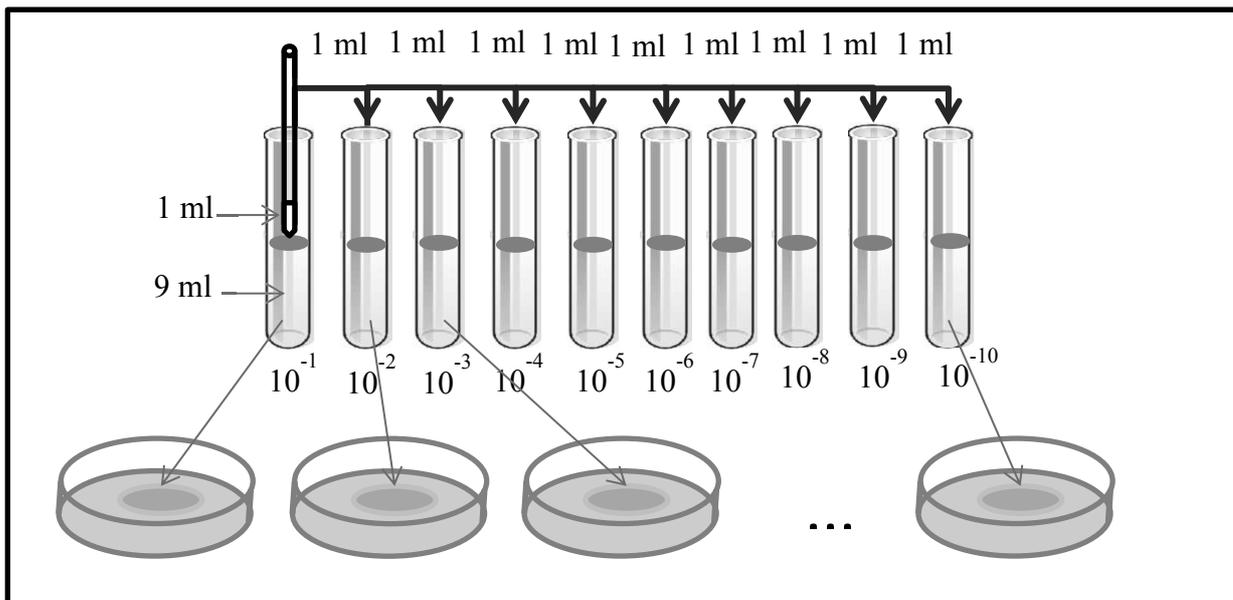


Figura 2 – Esquema representativo do processo de diluição seriada e dispensação das diluições em placas de petri no processo de isolamento de rizobactérias.

A partir das diluições, pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução e em seguida foram dispensados em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO e HESKETT, 1970) (Figura 2) e espalhados com alça de Drygalski. As placas foram incubadas em BOD a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 a 48 horas. Após este período, as colônias individuais formadas foram repicadas com alça de platina para tubos de ensaio contendo meio 523 inclinado, incubadas em BOD a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as colônias foram identificadas e preservadas tubo-a-tubo em refrigerador com temperatura média de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 60 dias.

#### 4.1.2. Preparo da Suspensão Bacteriana

As colônias bacterianas preservadas em refrigerador foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio 523 com o auxílio de uma alça de platina. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta acrescentou-se 70  $\mu\text{L}$  de água destilada espalhando as bactérias foram espalhadas no meio de cultura com uma alça de Drygalski e incubadas em BOD a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas.

As colônias formadas foram cuidadosamente raspadas e diluídas em água destilada e sua concentração ajustada para a densidade óptica de 0,4 de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro.

#### **4.1.3. Seleção Massal de Isolados**

Para condução de todos os experimentos com sementes de *P. taeda* o material vegetal utilizado foi cedido pela empresa MWV Rigesa e teve como origem um lote de sementes de 2012 provenientes de um Pomar Clonal.

Inicialmente, as sementes de *P. taeda* foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (p/v) por aproximadamente 2 minutos, e em seguida lavadas com água destilada esterilizada. Após este tratamento inicial, as sementes foram microbiolizadas por meio de imersão nas suspensões bacterianas preparadas conforme descrito no item 4.1.2, onde permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas. As sementes do tratamento testemunha foram submersas em água destilada pelo mesmo período de 24 horas. Em seguida as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de volume de 55 mL contendo meio ágar-água.

Foram utilizadas 12 repetições (sementes) por tratamento, para cada um dos 128 isolados obtidos. Os tubos de ensaio foram acondicionados em câmara germinadora durante o período de 30 dias com temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Aos 30 dias após a semeadura avaliou-se a porcentagem de germinação, altura de plântulas e comprimento de raíz.

O experimento foi dividido em duas etapas, na primeira delas testou-se 73 isolados bacterianos mais o tratamento controle. Na segunda etapa testou-se 55 isolados bacterianos mais o tratamento controle. O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizados, e os dados submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro utilizando o software SAEG 9.0.

#### **4.1.4. Avaliação dos Melhores Isolados**

Sementes de *P. taeda* foram desinfestadas com hipoclorito sódio (NaOCl) a 2% (p/v) por aproximadamente 2 minutos, e em seguida lavadas com água destilada esterilizada. Após este tratamento inicial, as sementes foram submetidas a dois experimentos com diferentes tratamentos:

- Experimento *In vitro*

Previamente à aplicação dos tratamentos, as sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas. Em seguida, as sementes foram submetidas a três diferentes tratamentos, sendo o primeiro a microbiolização por imersão das sementes na suspensão bacteriana dos três isolados selecionados por um período de 24 horas.

No segundo tratamento as suspensões bacterianas dos três isolados foram aplicadas diretamente em tubos de ensaio de volume aproximado de 55 mL contendo o meio ágar-água 48 horas antes da inoculação das sementes. No último tratamento a suspensão bacteriana foi aplicada nos tubos de ensaio dez dias após a inoculação das sementes.

O experimento foi conduzido em BOD, com temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial três formas de aplicação x três isolados mais o tratamento controle. Utilizou-se nove repetições (tubos de ensaio) por tratamento com 4 sementes por repetição. Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a porcentagem final de germinação, altura das plântulas e comprimento de raízes e o índice de velocidade de germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962).

$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + (G3/N3) + \dots + (Gn/Nn)$ , em que:

G1, G2, G3, ..., Gn = número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

N1, N2, N3, ..., Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

A porcentagem de germinação final foi obtida considerando todas as sementes germinadas, independentemente da formação de plântulas. Para plântulas avaliou-se ainda: comprimento de raiz e altura (considerada da base do coleto até o início das acículas). Realizou-se ainda uma avaliação visual de colonização bacteriana das raízes das plântulas, observando-se a formação de uma zona turva no entorno das raízes, que indicava a colonização.

Os dados do parâmetro IVG não atenderam às premissas para o teste de análise de variâncias e foram transformados pela raiz quadrada dos valores ( $IVG = \sqrt{IVG}$ ) e em seguida as médias transformadas foram analisados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o software SAEG 9.0.

- Experimento *ex vitro*

Este experimento foi conduzido no viveiro, utilizando-se os três isolados selecionados em duas formas de aplicação: *a)* microbiolização das sementes, na qual as sementes foram mantidas em suspensão bacteriana por 24 horas antes da semeadura; *b)* incorporação da suspensão diretamente ao substrato 48 horas antes da semeadura. As sementes do tratamento controle e aquelas utilizadas no tratamento de incorporação da suspensão no substrato foram mantidas em água destilada esterilizada pelo mesmo período que as sementes microbiolizadas.

Utilizou-se tubetes de plástico rígido de 55 cm<sup>3</sup> de volume, lavados e desinfestados em água quente (80°C por 1 minuto), preenchidos com substrato comercial Carolina Soil<sup>®</sup>. O experimento foi mantido por 90 dias em casa de sombra com tela de 50%. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial três isolados x duas formas de aplicação mais o tratamento controle, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição um tubete contendo uma semente.

Ao final de 90 dias foi determinada a porcentagem final de emergências e o IVE. Não foi possível a avaliação dos demais parâmetros de qualidade de muda, pois o experimento sofreu ataque de insetos-pragas culminando na morte das plântulas.

Os dados foram submetidos a ANOVA, e quando pertinente, as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o software SAEG 9.0.

## **4.2. Uso de Fitorreguladore e Rizobactérias na Miniestaquia de *P. taeda***

### **4.2.1. Descrição do Local**

Os ensaios experimentais descritos neste item 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.

A cidade de Irati, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, possui o tipo climático Cfb; caracterizando-se com temperatura média abaixo de 18°C nos meses mais frios e com ocorrência de geadas. Verão fresco com temperaturas dos meses mais quentes abaixo de 22°C e sem estação de seca definida, e com pluviosidade média

anual de 1476 mm (IAPAR, 2012).

#### **4.2.2. Estabelecimento, Condução e avaliação do Minijardim Clonal**

O sistema de minijardim clonal foi composto por 200 vasos de 5 litros com substrato inerte (areia grossa lavada) e em cada vaso foi transplantada uma muda de *P. taeda* com idade de 75 dias, a qual formou posteriormente uma minicepa que foi considerada uma unidade amostral. A poda de formação foi realizada 20 dias após o transplantio das mudas mediante a retirada do ápice das mudas, a aproximadamente 10 cm de altura.

O manejo hídrico do minijardim foi realizado diariamente, por meio de mangueira com volume de água variando conforme as condições ambientais do dia. A nutrição foi realizada pela aplicação de solução nutritiva adaptada de Andrejow (2006) adaptada, em intervalos de 15 dias entre aplicações. A solução teve seu pH medido com peagâmetro e ajustado à faixa de 5,5 a 5,8, utilizando-se soluções de ácido clorídrico (HCl) 1N e hidróxido de sódio (NaOH) 1 N. A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida entre 1 e 2 mS.cm<sup>-1</sup>, medida com condutivímetro elétrico.

Vinte dias após a poda do ápice, iniciou-se a aplicação do BAP em diferentes concentrações em mg.L<sup>-1</sup> (0; 0,5; 2,5 e 10). O fitorregulador foi aplicado via solução nutritiva em intervalos mensais a um volume estabelecido de 80 mL por minicepa, finalizando um volume de 16 mL por aplicação. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com 4 repetições compostos por 12 minicepas.

As minicepas não sofreram podas de condução. Quando pertinente e em quantidade suficiente, as brotações formadas foram utilizadas para condução de um terceiro ensaio experimental.

Foram realizadas contagens semanais do número de brotações produzidas por minicepa em cada tratamento, considerando aquelas com comprimento superior a 0,5 cm. As miniestacas coletadas de cada uma das minicepas foram contabilizadas e somadas ao número de brotações produzidas, não interferindo assim na avaliação de produção de brotações.

Avaliou-se as médias da produção de brotações aos 30, 90, 150 e 225 dias.

Os dados foram submetidos à ANOVA e quando pertinente suas médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o software SAEG 9.0.

#### 4.2.3. Coleta e Preparo de Miniestacas e Aplicação de Rizobactérias

Após o estabelecimento do minijardim clonal foram realizadas duas coletas de miniestacas, respectivamente nos meses de junho e setembro. Foram preparadas miniestacas com altura entre 5 a 8 cm de comprimento. As coletas foram realizadas no período matutino a fim de evitar o estresse hídrico. Em seguida as miniestacas foram acondicionadas em caixas de isopor com água gelada até momento do estaqueamento.

Previamente ao estaqueamento em substrato, as miniestacas foram tratadas com suspensão bacteriana de dois isolados de rizobactérias, por meio da imersão das miniestacas em suspensão de propágulos das bactérias promotoras ( $10^8$  u.f.c. mL<sup>-1</sup>) por 30 minutos (KIJIMA *et al.*, 1995).

Em seguida, estas miniestacas foram estaqueadas em tubetes de plástico rígido com volume de 55 cm<sup>3</sup> contendo substrato comercial Carolina Soil<sup>®</sup> e acrescido de 150 g/m<sup>3</sup> de adubo de liberação lenta Basacote<sup>®</sup> 16-08-12 (N-P-K). As miniestacas foram mantidas em casa de vegetação (Figura 3) em condições de temperatura controlada,  $25 \pm 2$  °C e irrigação por nebulização intermitente, com umidade relativa do ar acima de 80%.

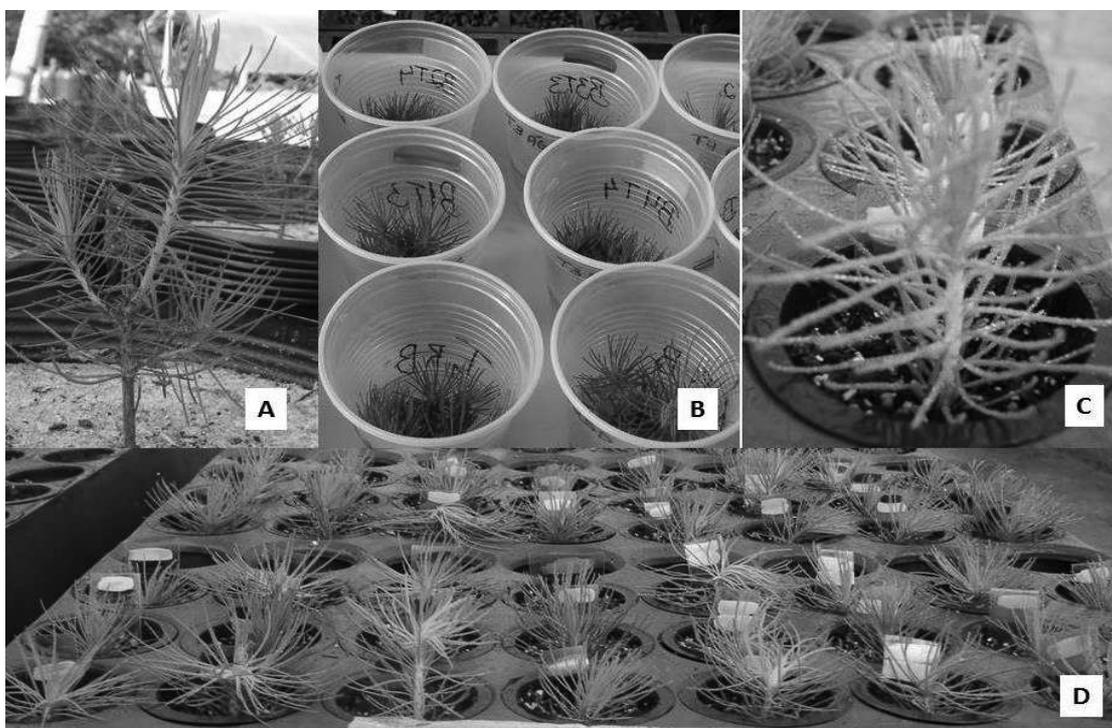


Figura 3 – Miniestaquia e aplicação de rizobactérias em mudas de *P. taeda*. Fases de montagem do ensaio de produção de mudas. (A) brotação de *P. taeda* em tamanho ideal de coleta; (B) imersão das miniestacas na suspensão bacteriana; (C) estaqueamento; (D) miniestacas de *P. taeda* mantidas em casa de vegetação.

Os ensaios foram montados com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial quatro doses de BAP em  $\text{mg.L}^{-1}$  (0,0; 0,5; 2,5 e 10) e dois isolados de rizobactérias aplicadas nas minicepas. Foram utilizadas dez miniestacas por repetição. As miniestacas permaneceram 30 dias em casa de vegetação, 30 dias em casa de sombra e 30 dias a pleno sol, totalizando assim 90 dias.

Aos 90 dias avaliou-se o percentual de enraizamento das miniestacas por meio de avaliação destrutiva. Para as mudas enraizadas avaliou-se a altura, o diâmetro de colo, o comprimento da maior raiz, a massa seca de raízes, a parte aérea e total, e o índice de qualidade de Dickson (IQD). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x}$  (raiz quadrada do valor), em seguida foram submetidos a ANOVA e quando pertinente as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o software SAEG 9.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação dos Isolados Bacterianos

#### 5.1.1. Seleção Massal dos Isolados

Na primeira etapa a utilização dos isolados apresentou efeito significativo para os parâmetros altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) (Tabela 1). O teste de médias identificou 22 isolados bacterianos que diferiram da testemunha para a altura das plântulas, e 26 isolados eficientes em estimular o crescimento de raiz e destes 21 tiveram efeitos significativos para ambas as variáveis (Tabela 2).

Para a segunda etapa observou-se diferenças significativas entre os tratamentos nos três parâmetros avaliados (Tabela 1). Todavia nenhum dos isolados apresentou médias estatisticamente superiores se comparadas à testemunha (Tabela 3).

Com base nas melhores respostas obtidas nas duas etapas do experimento selecionou-se três isolados, os quais são referentes aos seguintes códigos: 3C, 35E e 25D. A escolha do isolado 3C baseia-se no resultado estatístico dos testes de altura e comprimento de raiz, em que este foi estatisticamente superior à testemunha, além de ter sido o tratamento que obteve o maior valor de germinação em relação aos demais isolados. Os isolados 35E e 25D, referentes ao segundo ensaio, apesar de não apresentar diferenças estatísticas com relação a testemunha, foram selecionados pois foram os tratamentos que obtiveram as melhores médias para todas as variáveis observadas.

Tabela 1 - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) de sementes e plântulas de *P.taeda* em relação aos tratamentos avaliados na primeira e segunda etapa do experimento de seleção massal de isolados bacterianos aos 30 dias de semeadura.

ANOVA – Primeira etapa					ANOVA – Segunda etapa				
Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios			Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		GER	H	CR			GER	H	CR
Tratamentos	73	23,7 <sup>ns</sup>	12,6 <sup>*</sup>	1,3 <sup>*</sup>	Tratamentos	55	25,8 <sup>**</sup>	19,5 <sup>**</sup>	2,3 <sup>**</sup>
Resíduo	814	24,6	8,9	1,0	Resíduo	616	16	12,1	1,4
Total	887				Total	671			

<sup>(ns)</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(\*)</sup> e <sup>(\*\*)</sup> Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

Tabela 2 - Média da porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) do primeira etapa do experimento de germinação *in vitro* de sementes de *P. taeda* aos 30 dias de semeadura.

Médias Primeira Etapa <i>In vitro</i>							
Isolado	GERM (%)	ALT (cm)	CR (cm)	Isolado	GERM (%)	ALT (cm)	CR (cm)
3C	91,7	3,62 a	1,02 a	18A	58,3	1,03 b	0,47 b
1A	83,3	1,43 b	0,50 b	1B	58,3	1,60 b	0,48 b
2A	83,3	2,79 a	0,94 a	3B	58,3	1,65 b	0,45 b
7A	83,3	4,55 a	1,27 a	1C	58,3	2,94 a	0,90 a
16A	83,3	1,76 b	0,55 b	9C	58,3	1,88 b	0,75 a
5A	75	3,42 a	0,95 a	12C	58,3	2,85 a	0,87 a
15A	75	4,27 a	1,58 a	14C	58,3	2,20 b	0,80 a
17A	75	3,62 a	1,02 a	5D	58,3	0,79 b	0,34 b
4B	75	1,37 b	0,61 b	9D	58,3	4,12 a	1,43 a
10C	75	2,65 a	0,71 a	16D	58,3	3,39 a	0,85 a
15C	75	1,65 b	0,34 b	2B	50	1,34 b	0,37 b
19C	75	3,18 a	0,78 a	4C	50	1,87 b	0,47 b
7D	75	3,33 a	1,02 a	6C	50	2,29 a	0,67 b
12A	66,7	1,42 b	0,51 b	13C	50	1,54 b	0,63 b
14A	66,7	2,38 a	0,77 a	16C	50	1,19 b	0,29 b
7C	66,7	1,83 b	0,53 b	18C	50	1,04 b	0,34 b
8C	66,7	3,14 a	0,99 a	22C	50	1,42 b	0,58 b
17C	66,7	3,10 a	0,95 a	23C	50	1,97 b	0,48 b
20C	66,7	1,02 b	0,40 b	18D	50	2,65 a	0,61 b
24C	66,7	1,62 b	0,63 b	22D	50	1,15 b	0,45 b
26C	66,7	1,77 b	0,67 b	TEST	41,7	1,18 b	0,52 b
31C	66,7	1,03 b	0,37 b	10A	41,7	0,67 b	0,32 b
2D	66,7	2,16 b	0,72 a	5C	41,7	0,24 b	0,13 b
6D	66,7	1,82 b	0,57 b	11C	41,7	0,29 b	0,19 b
8D	66,7	0,62 b	0,33 b	25C	41,7	1,15 b	0,39 b
10D	66,7	0,52 b	0,18 b	27C	41,7	1,15 b	0,30 b
13D	66,7	1,16 b	0,29 b	29C	41,7	0,95 b	0,27 b
15D	66,7	3,85 a	1,16 a	30C	41,7	0,52 b	0,09 b
17D	66,7	2,00 b	0,62 b	3D	41,7	2,22 b	0,69 b
19D	66,7	2,56 a	0,88 a	4D	41,7	1,90 b	0,89 a
23D	66,7	3,63 a	1,58 a	11D	41,7	1,27 b	0,35 b
3A	58,3	2,77 a	0,75 a	12D	41,7	0,75 b	0,12 b
4A	58,3	2,30 a	1,01 a	14D	41,7	1,58 b	0,49 b
6A	58,3	1,38 b	0,49 b	2C	33,3	1,23 b	0,52 b
8A	58,3	2,07 b	0,90 a	28C	33,3	1,20 b	0,29 b
9A	58,3	0,98 b	0,28 b	20D	33,3	0,43 b	0,17 b
13A	58,3	1,35 b	0,41 b	21C	25	1,25 b	0,27 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 - Média da porcentagem de germinação (GER), altura (ALT) e comprimento de raiz (CR) da segunda etapa do experimento de germinação *in vitro* de sementes de *P. taeda* aos 30 dias de semeadura.

Médias Segundo Etapa <i>In vitro</i>							
Isolado	GERM (%)	ALT (cm)	CR (cm)	Isolado	GERM (%)	ALT (cm)	CR (cm)
35E	100,0 a	7,2 a	2,3 a	37E	83,3 a	4,8 b	1,6 b
25D	100,0 a	7,1 a	2,2 a	15E	75,0 b	6,0 a	1,9 a
6E	100,0 a	6,9 a	1,7 a	42E	75,0 b	5,1 b	1,6 b
7E	100,0 a	6,8 a	1,5 b	10E	75,0 b	4,9 b	1,6 b
47E	100,0 a	6,1 a	1,8 a	18E	75,0 b	4,8 b	1,8 a
24E	100,0 a	5,1 b	1,6 b	43E	75,0 b	4,8 b	1,3 b
39E	91,7 a	6,4 a	2,3 a	34E	75,0 b	4,6 b	1,4 b
11E	91,7 a	6,3 a	2,0 a	39C	75,0 b	4,4 b	1,4 b
27E	91,7 a	6,3 a	2,3 a	24D	75,0 b	4,3 b	1,4 b
37C	91,7 a	6,2 a	0,9 b	21E	75,0 b	4,2 b	1,1 b
9E	91,7 a	6,2 a	1,9 a	35C	75,0 b	3,5 b	1,1 b
45E	91,7 a	6,2 a	1,6 b	31E	75,0 b	3,5 b	1,2 b
36C	91,7 a	6,1 a	1,5 b	14E	66,7 b	5,0 b	1,6 b
41C	91,7 a	6,0 a	2,2 a	44E	66,7 b	4,9 b	1,6 b
1E	91,7 a	6,0 a	2,1 a	38E	66,7 b	4,8 b	1,3 b
23E	91,7 a	6,0 a	2,2 a	32E	66,7 b	4,7 b	1,5 b
22E	91,7 a	5,9 a	2,0 a	4E	66,7 b	4,3 b	1,0 b
TEST	91,7 a	5,7 a	1,8 a	17E	66,7 b	4,2 b	1,5 b
38C	91,7 a	5,35 a	1,1 b	26E	66,7 b	3,9 b	1,4 b
40E	91,7 a	5,1 b	1,6 b	12E	66,7 b	3,3 b	1,3 b
34C	91,7 a	4,7 b	1,6 b	13E	58,3 b	4,9 b	1,1 b
20E	83,3 a	6,7 a	2,3 a	36E	58,3 b	4,4 b	1,5 b
19E	83,3 a	6,6 a	2,0 a	33C	58,3 b	4,1 b	1,3 b
8E	83,3 a	6,4 a	2,3 a	5E	58,3 b	3,8 b	1,2 b
33E	83,3 a	5,7 a	2,2 a	2E	58,3 b	3,0 b	1,2 b
28E	83,3 a	5,3 a	1,6 b	29E	50,0 b	2,8 b	0,9 b
16E	83,3 a	5,2 a	1,4 b	41E	50,0 b	2,6 b	1,0 b
40C	83,3 a	4,8 b	1,5 b	32C	41,7 b	0,6 b	0,2 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A ausência do efeito na germinação de sementes na primeira etapa pode ser devido à característica intrínseca da associação rizobactérias-raízes. Assim os efeitos da associação microrganismo-planta, seja na proteção do tecido vegetal quanto ao ataque de patógenos, fixando nitrogênio do ar e disponibilizando no meio em que se encontra, induzindo a produção de hormônio nas plantas (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001), auxiliando na expansão do sistema radicular (VESSEY, 2003) somente ocorrem após a formação dos primórdios radiculares, não influenciando o processo germinativo.

No segundo ensaio, as sementes tratadas com 27 isolados obtiveram porcentagens de germinação inferiores à testemunha (Tabela 2), o que pode remeter a um possível efeito deletério causado pelos isolados em questão. Sabe-se que algumas *Pseudomonas* spp. utilizadas como promotoras de crescimento de plantas, sintetizam o gás Cianeto de Hidrogênio (HCN), o qual tem efeito negativo sobre o metabolismo e crescimento radicular (SCHIPPERS *et al.*, 1990). Como estes, podem haver vários mecanismos deletérios de rizobactérias à plantas, pois a maioria das rotas bacterianas não são totalmente elucidadas e aquelas que possuem maior conhecimento são de caráter positivo (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; PRATHAP; RANJITHA KUMARI, 2015).

Os incrementos de altura e comprimento de raízes (Tabela 2) observados em alguns dos tratamentos tem sido semelhantes a diversos outros trabalhos utilizando rizobactérias. Estes efeitos são ainda maiores quando utilizado em plantas já formadas em condições de viveiro.

Em ensaio *in vitro* Marques *et al.* (2014) observaram efeito promotor com o uso de bactérias extremófilas facultativas, *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp., isoladas em condições específicas de pH e NaCl para a velocidade de germinação em sementes de *Eucalyptus urophylla*. Resultados semelhantes foram obtidos por Schlindwein *et al.* (2008) em sementes de alface. O aumento da porcentagem de germinação de sementes microbiolizadas foi observado ainda por Campello (1992) em sementes de *Eucalyptus* spp. e em sementes de arroz por Araujo *et al.* (2010).

Em condições de viveiro, Brunetta *et al.* (2010) relataram que em mudas de *P. taeda* houver incremento em diversas variáveis da qualidade de mudas como, altura da parte aérea, massa seca de raízes e parte aérea, diâmetro do coleto quando aplicados isolados de rizobactérias no substrato da muda. Resultados similares foram encontrados ainda para *Eucalyptus* spp. por Mafia *et al.* (2007), em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, por Marques e Uesugi (2013), e em *Citrus* spp. por Freitas e Vildoso (2004).

### **5.1.2. Avaliação dos três melhores isolados**

Observou-se efeito significativo dos isolados e forma de aplicação sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 4). Não foi observado efeito

significativo para interação entre os tratamentos, germinação, altura e comprimento de raízes.

Tabela 4 - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER), altura (ALT), comprimento de raiz (CR) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes e plântulas de *P.taeda* em relação aos tratamentos aplicados *in vitro*, avaliados aos 30 dias de semeadura.

ANOVA – Avaliação dos três isolados selecionados em ensaio <i>in vitro</i>					
Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios			
		GER	H	CR	IVG
Formas de Aplicação	2	734,9 <sup>ns</sup>	1,81 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>ns</sup>	0,05*
Isolados	3	345,3 <sup>ns</sup>	2,04 <sup>ns</sup>	2,67 <sup>ns</sup>	0,04*
Interação Formas de aplicação x Isolados	6	356,9 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	2,06 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	422,4	1,33	1,92	0,03
Resíduo	96	354,5	1,38	1,41	0,01
Total	107				

<sup>(ns)</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(\*)</sup> e <sup>(\*\*)</sup> Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

A aplicação da suspensão bacteriana no meio ágar-água 48 horas após a inoculação das sementes *in vitro* foi o tratamento mais eficaz entre os testados quanto ao índice de velocidade de germinação, independentemente do isolado bacteriano utilizado, diferindo estatisticamente do tratamento de aplicação da suspensão bacteriana no meio antes da inoculação das sementes no meio, porém não diferindo estatisticamente do tratamento de microbiolização das sementes (Tabela 5).

A microbiolização é a forma de aplicação mais utilizada para avaliar a eficiência de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, e/ou agentes de biocontrole *in vitro*, sendo raro encontrar trabalhos que relatem a investigação de outro tipo de aplicação. Por outro lado, em trabalhos *ex vitro* outras formas de aplicação são reportadas.

Ferraz *et al.* (2008) testaram diferentes formas de dispensas de rizobactérias para controle para uma doença do tomateiro, porém neste caso a microbiolização foi a forma mais eficiente.

Ao comparar a microbiolização de sementes de tomate, à pulverização no filoplano de um agente de biocontrole, Neves (2005) observou a maior eficácia da

microbiolização, a qual influenciou positivamente o controle de doenças. Mafia *et al.* (2009) testaram a aplicação de PGPR's em sistema de produção de mudas clonais de *Eucalyptus spp.* por miniestaquia sob diferentes formas de aplicação. Os autores observaram que todas as formas de aplicação das rizobactérias foram eficazes para a promoção de crescimento.

Tabela 5 – Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de *P. taeda*, submetidas a formas de aplicação e isolados de rizobactérias, para o experimento *in vitro*, avaliados aos 30 dias de inoculação das sementes no meio.

<b>Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) dos Tratamentos</b>	
<b>Formas de Aplicação</b>	<b>Médias</b>
T1 - Microbiolização das Sementes	0,25 ab
T2 - Aplicação da suspensão bacteriana no meio ágar/água 48 horas antes da inoculação das sementes no meio.	0,20 b
T3 - Aplicação da suspensão bacteriana no meio ágar/água dez dias após a inoculação das sementes no meio.	0,28 a
<b>Isolados</b>	<b>Médias</b>
Testemunha – Água	0,20 b
Isolado bacteriano - código 25D	0,29 a
Isolado bacteriano - código 3C	0,22 ab
Isolado bacteriano – código 35E	0,26 ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram observados por Melo *et al.* (2012) em condições *ex vitro*, comparando-se a pulverização e a incorporação do microrganismo antagonista ao substrato. A incorporação do microrganismo no substrato incrementou a massa fresca de raiz e de parte aérea. Outros autores destacam que a forma de aplicação do agente promotor de crescimento é dependente do microrganismo utilizado, da prática silvicultural adotada ou da interação entre o agente promotor e a planta eliciada.

Na avaliação visual de colonização foi observada uma zona turva de células bacterianas em volta das raízes de pelo menos uma das plântulas de cada tratamento os quais as bactérias foram aplicadas, o que caracteriza os isolados utilizados como PGPR's.

Quanto ao ensaio realizado *ex vitro* não houve efeito significativo da forma de

aplicação ou interação entre os fatores, tanto para a porcentagem de emergência, quanto para o IVE. A aplicação dos isolados não influenciou a porcentagem de emergência, porém teve efeito significativo no índice de velocidade de emergência (IVE) (Tabela 6). O isolado (25D) mostrou-se o melhor tratamento para esta variável analisada, tanto no ensaio *in vitro*, quanto *ex vitro* (Tabelas 5 e 7).

Tabela 6 - Análise de variância para a porcentagem de germinação (GER) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes e plântulas de *P.taeda* em relação aos tratamentos aplicados *ex-vitro*, avaliados aos 30 dias de semeadura.

<b>ANOVA – Avaliação dos três isolados selecionados – <i>ex-vitro</i></b>			
Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		GER	IVG
Formas de Aplicação	1	112,5 <sup>ns</sup>	0,00005 <sup>ns</sup>
Isolados	3	1279,2 <sup>ns</sup>	0,00147*
Interação Formas de aplicação x Isolados	3	1212,5 <sup>ns</sup>	0,00044 <sup>ns</sup>
Tratamentos	7	1083,9	0,00083
Resíduo	24	529,2	0,00035
<b>Total</b>	<b>31</b>		

<sup>(ns)</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(\*)</sup> e <sup>(\*\*)</sup> Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

Tabela 7 – Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) para os tratamentos aplicados *ex-vitro*, avaliados aos 30 dias de semeadura.

<b>Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) dos Tratamentos</b>	
<b>Isolados</b>	<b>Médias</b>
Testemunha – Água	0,035 b
Isolado bacteriano - código 25D	0,062 a
Isolado bacteriano - código 3C	0,033 b
Isolado bacteriano – código 35E	0,046 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para a promoção de crescimento em *P. taeda* Brunetta *et al.* (2010) identificaram aproximadamente 10% dos isolados atuando como promotores de crescimento em algum dos parâmetros avaliados. Marques e Uesugi (2013) constataram incrementos em diversos parâmetros de qualidade de mudas de *E. grandis* x *E.*

*urophylla* chegando a apresentar até 130% a mais na biomassa radicular com a utilização de bactérias.

Marques *et al.* (2014) constataram um aumento na velocidade de germinação de sementes de *E. urophylla* com o uso de bactérias extremófilas, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, onde as sementes tratadas com o isolado 25D tiveram sua germinação acelerada. O aumento do IVG é uma característica muito desejada em viveiros florestais. Não só a germinação precoce acelera o crescimento da muda, como evita o ataque de doenças fúngicas, pois reduz o tempo em que as sementes devem ficar expostas a adversidades. Além de ganhos na qualidade da muda, a redução do tempo de formação da mesma gera economias e reduz o valor da produção.

Em ambas as condições experimentais avaliadas (*in vitro* e *ex vitro*), o isolado bacteriano 25D mostrou-se promissor para a promoção de crescimento inicial de mudas. A principal vantagem relatada quanto ao uso de PGPR's acontece após a germinação, e geralmente é expressa em parâmetros como altura, diâmetro do coleto ou biomassa. A seleção massal de isolados *in vitro* pode ser uma boa alternativa para esta primeira seleção, todavia é de extrema importância que se obtenha protocolos para seleção de microrganismos antagonistas em testes mais rápidos, de forma a conseguir uma pré-seleção, pois na maioria das vezes a seleção massal restringe-se devido à necessidade de uma estrutura física mais ampla para realização deste tipo de testes. Desta forma, outros estudos visando o estabelecimento de protocolos de seleções de PGPR's devem ser realizados.

## **5.2. Produção de brotações em minijardim clonal sob diferentes concentrações de fitorregulador**

Não houve efeito significativo para o número de brotações produzidas, sob nenhuma das doses do regulador de crescimento aplicadas, independentemente do número de doses aplicadas (Tabela 8).

O fato da aplicação do BAP não ter influenciado na produção de brotações, rejeita a hipótese proposta neste trabalho, pois uma vez que este regulador faz parte do grupo de hormônios denominado citocinina, a premissa era que houvesse um aumento do número de brotações produzidas por minicepa.

Uma das funções biológicas das citocininas nas plantas é a quebra da

dominância apical e crescimento de gemas laterais. Aplicações diretas deste regulador de crescimento em plantas deveria estimular a formação destas gemas (TAIZ e ZEIGER, 2006). Porém, é possível perceber segundo os relatos de literatura que esta teoria é variável de acordo com a espécie estudada. Da mesma forma que neste trabalho, Oliveira et al. (2011) ao testar diferentes concentrações de BAP para multiplicação de *P. taeda in vitro* não observaram diferenças estatísticas para as diferentes dosagens do fitorregulador quando comparado ao tratamento controle.

A aplicação *ex vitro* da citocinina denominada thidiazuron TDZ em minicepas de *E. urophylla* x *E. grandis*, não afetou o número de brotações produzidas (FREITAG, 2013).

O uso de citocininas em plantas para estimular a produção de brotações *in vivo* ainda é pouco estudada, muito provavelmente pelo efeito que ela exerce sobre o balanço da relação auxina x citocinina da planta (TAIZ e ZEIGER, 2004), o que diminuiria a porcentagem de enraizamento adventício de plantas lenhosas.

Em trabalhos testando o uso das citocininas *in vitro*, foi verificada influência positiva para produção de brotações e gemas axilares para *E. dunni* (GRAÇA et al., 2001; NAVROSKI, 2011).

Tabela 8 - Análise de variância para a número de brotações produzidas por minicepa sob a aplicação de diferentes doses do regulador de crescimento BAP, aos 30, 90, 150 e 225 dias após a aplicação do regulador (DAPR).

**ANOVA – Número de brotações produzidas nos diferentes tratamentos**

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios			
		30 DAPR	90 DAPR	150 DAPR	225 DAPR
Doses aplicadas	3	0,7135ns	0,8472ns	0,8385ns	6,3385ns
Blocos	3	3,9219**	5,6944**	4,8108*	12,5885*
Doses aplicadas x Blocos	9	0,1626*	0,3935ns	2,0052ns	6,6904ns
Resíduo	176	0,6965	1,051	1,634	3,86411
<b>Total</b>	<b>191</b>				

<sup>(ns)</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(\*)</sup> e <sup>(\*\*)</sup> Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

**5.3. Efeito do regulador de crescimento e das rizobactérias no enraizamento das miniestacas e qualidade de mudas de *P. taeda*.**

A variável diâmetro do coleto sofreu influência significativa tanto para as

doses de BAP aplicadas, quanto para os isolados bacterianos, porém estes efeitos foram observados individualmente, não havendo interação entre eles para a primeira coleta, porém este efeito não foi contínuo, não se manifestando na segunda coleta (Tabela 9).

Não houve efeito significativo da aplicação do BAP e utilização dos isolados bacterianos para as variáveis porcentagem de enraizamento, comprimento de raízes, massa seca de raiz e parte aérea e Índice de Qualidade de Dickson para ambas as coletas (Tabela 9).

O diâmetro do colo das mudas de *P. taeda* provenientes da primeira coleta de brotações e submetidas ao tratamento de imersão em suspensão das bactérias também foi estatisticamente superior para os dois isolados bacterianos (25D e 35E) quando comparados ao tratamento controle (Tabela 11).

As mudas formadas a partir de miniestacas oriundas de minicepas tratadas com a aplicação das doses de BAP também sofreram influência na variável altura. A aplicação de  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de BAP resultou em redução da altura das miniestacas, comparadas a testemunha. As doses  $0,5$  e  $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  não diferiram estatisticamente da testemunha nem do tratamento  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Tabela 12).

Tabela -9 – Análise de variância para enraizamento (ENR), comprimento de raízes formadas em (cm) (CR), diâmetro do colo das mudas formadas (mm) (DIAM), altura da parte aérea das mudas formadas (cm) (ALT), índice de qualidade de Dickson (IQD) massa seca de raízes em gramas (MSRA), massa seca de parte aérea em gramas (MSPA) em mudas de *P. taeda*, formadas a partir da aplicação de diferentes doses do regulador de crescimento BAP, e dois isolados bacterianos em duas coletas.

**Tabela da Análise de Variância (ANOVA) de diferentes variáveis avaliadas para mudas de *P. taeda*.**

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios													
		Coleta 1													
		ENR	CR	DIAM	ALT	IQD	MSRA	MSPA	ENR	CR	DIAM	ALT	IQD	MSRA	MSPA
Doses de BAP	3	0,364	ns	25,157	ns	0,646	*	0,244	*	0,014	ns	0,036	ns	0,006	ns
Isolados bacterianos	2	0,075	ns	5,37	ns	0,928	*	0,152	ns	0,001	ns	0,004	ns	0,005	ns
Interação Doses BAP X Isolados	6	0,297	ns	36,716	ns	0,372	ns	0,102	ns	0,001	ns	0,014	ns	0,003	ns
Tratamentos	11	0,275	ns	27,864	ns	0,548	**	1,646	ns	0,001	ns	0,018	ns	0,004	ns
Resíduo	108	0,249		35,587		0,203		9,35		0,012		0,022		0,005	

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios													
		Coleta 2													
		ENR	CR	DIAM	ALT	IQD	MSRA	MSPA	ENR	CR	DIAM	ALT	IQD	MSRA	MSPA
Doses de BAP	3	0,475	ns	67,414	ns	2,367	ns	41,181	ns	0,107	ns	0,035	ns	0,217	ns
Isolados bacterianos	2	0,1	ns	15,415	ns	2,092	ns	50,34	ns	0,006	ns	0,019	ns	0,289	ns
Interação Doses BAP X Isolados	6	0,233	ns	25,57	ns	1,552	ns	29,253	ns	0,004	ns	0,012	ns	0,182	ns
Tratamentos	11	0,275	ns	35,135	ns	1,912	ns	36,34	ns	0,006	ns	0,02	ns	0,211	ns
Resíduo	108	0,249		36,654		1,257		21,102		0,005		0,015		0,14	
Total	119														

<sup>(ns)</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(\*)</sup> e <sup>(\*\*)</sup> Valor significativo significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

Tabela 10 – Diâmetro do colo de miniestacas de *P. taeda*, provenientes de minicepas tratadas com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP.

<b>Médias Diâmetro do Coleto (mm) de mudas de <i>P. taeda</i> - Coleta 1</b>	
<b>Doses de BAP (mg/L)</b>	<b>Média Diâmetro (mm)</b>
0,0	1,70 B
0,5	1,89 AB
2,5	1,84 AB
10	2,05 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 11 – Diâmetro do colo de miniestacas de *P. taeda*, imersas em suspensões de isolados bacterianos.

<b>Médias Diâmetro do Coleto (mm) de mudas de <i>P. taeda</i> - Coleta 1</b>	
<b>Isolado Bacteriano</b>	<b>Média Diâmetro (mm)</b>
Testemunha	1,7 B
Isolado bacteriano - código 25 D	1,94 A
Isolado bacteriano - código 35 E	1,98 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 12 – Altura de miniestacas de *P. taeda*, provenientes de minicepas tratadas com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP.

<b>Média Altura da parte aérea (cm) de mudas de <i>P. taeda</i> - Coleta 1</b>	
<b>Doses de BAP (mg/L)</b>	<b>Altura (cm)</b>
0,0	6,06 A
0,5	5,91 AB
2,5	5,05 B
10	5,45 AB

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Não houve efeito significativo do BAP para enraizamento. Embora o balanço entre os diversos hormônios existentes no vegetal regulam o processo de enraizamento, sobretudo auxina/citocinina (TAIZ e ZEIGER, 2004; XAVIER *et al.*, 2013). Acredita-se que a aplicação exógena de citocinina não tenha interferido neste balanço, de modo que o BAP teve efeito nulo no enraizamento adventício.

O uso do BAP em meio de cultivo de plantas micropropagadas já é consolidado,

porém as concentrações variam dependendo da espécie trabalhada, e muitas vezes dentro da mesma espécie mas entre diferentes genótipos, como mostra Cordeiro *et al.* (2014) quando comparam diferentes genótipos de *Eucalyptus globulus* em diferentes concentrações deste regulador.

Para o uso em meio de cultura, as concentrações utilizadas são baixas, geralmente chegando a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , para espécies de eucalipto. Porém, neste trabalho por se tratar de miniestaquia especialmente de uma espécie conífera a concentração e frequência de aplicação utilizada podem ter sido inferiores aos requeridos para esta espécie. Esta hipótese é reforçada pelo fato da aplicação do produto não ter afetado a produção de brotações. Neste caso, o aumento da concentração poderia trazer benefícios à produção de brotações.

Oliveira *et al.* (2011) não obtiveram aumento na multiplicação de explantes micropropagados de *P. taeda* em um meio contendo BAP quando comparado ao controle. Porém obteve o melhor enraizamento dos explantes no tratamento quando este regulador combinado a uma auxina estava presente. Apesar da resposta ter sido observada *in vitro*, esses resultados ajudam a explicar a ausência de efeito do uso isolado do BAP. O fato de que o fornecimento de ambos os fitorreguladores auxina e citocinina ter resultado em um aumento da taxa de enraizamento de explantes *in vitro* pode estar associada a uma deficiência endógena da espécie, principalmente por se tratar de uma espécie conífera e pouco estudada neste sentido. Segundo Mott e Amerson (1981) o uso combinado destes reguladores na micropropagação de *P. taeda* é comum para a promoção de enraizamento.

Apesar de ter mostrado influência positiva no aumento do diâmetro do colo na primeira coleta, o uso dos dois isolados de rizobactérias não promoveram os resultados desejados em relação aos outros parâmetros avaliados, quando aplicados em miniestacas. Este fato pode estar diretamente relacionado ao fato de que estas foram selecionadas *in vitro* em plantas provindas de sementes, ou seja, plantas que possuem desde a germinação a presença de um sistema radicular. Uma vez que estas bactérias estão associadas as raízes das plantas, o seu uso em miniestaquia e a forma de aplicação podem ter sido a causa da ineficácia destes promotores de crescimento. Sabendo-se que plantas de coníferas minipropagadas podem emitir raízes até 60 dias após o estaqueamento, isto pode ter impedido a formação das colônias bacterianas e o seu estabelecimento na rizosfera estudada.

Uma alternativa para o uso destes promotores em miniestaquia de forma mais eficiente pode ser a incorporação destes ao substrato, ou até mesmo no minijardim clonal. Mafia *et al.* (2005) obtiveram resultados satisfatórios para eucalipto, tanto no crescimento de

mudas quando utilizaram o isolado misturado ao substrato, quanto na produção de brotações no minijardim clonal quando este foi o local de inoculação das rizobactérias.

Para continuidade deste trabalho, é essencial que novas metodologias sejam testadas. No caso de aplicação do regulador de crescimento BAP, uma boa alternativa é o testes de dosagens maiores, assim como a aplicação deste regulador associada a auxinas, tratamentos que vem se mostrando eficientes para esta espécie em cultivo *in vitro*.

Para a aplicação e uso de rizobactérias é necessário testar principalmente novas formas de inoculação, uma vez que houve diferença de resposta da muda clonal para a seminal. Como sugestão de um trabalho subsequente, a incorporação do isolado no substrato de estaquia pode ser uma boa alternativa de teste.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram selecionados três isolados bacterianos potenciais para promoção de crescimento de mudas seminais de *P. taeda*, porém não foi possível selecionar nenhum isolado que promova o enraizamento miniestacas desta espécie.

A aplicação de regulador de crescimento em minicepas de *P. taeda*, para promoção do crescimento ou aumento da taxa de enraizamento em miniestacas não foi significativamente superior quando comparado a testemunha, salvo algumas características específicas, porém apenas em uma das coletas.

As concentrações de BAP utilizadas não foram eficientes para promover o aumento da produção de brotações em minicepas de *P. taeda* e não influenciaram no enraizamento destas brotações.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, 2012, Brasil. **Anuário estatístico da ABRAF. Brasília**, 2012. 145 p. Disponível em: <www.abraflor.org.br>. Acesso em: 15 de maio de 2013.

ALCANTARA, G.B. de. **Miniestaquia de *Pinus taeda* L.** 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Ufpr, Curitiba, 2005.

ALCANTARA, G.B.; RIBAS, L.L.F.; HIGA, A.R.; RIBAS, K.C.Z.; KOEHLER, H.S. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p.399-404, 2007.

ALFENAS, A.C.; ZAURA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 422 p.

ANDREJOW, G.M.P. **MINIJARDIM CLONAL DE *Pinus taeda* L.** 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós- Graduação em Engenharia Florestal, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANDREJOW, G.M.P.; HIGA, A.R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 4, p.897-903, 2009.

ARAÚJO, A. E. S. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.4, p.932-939, 2010.

ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning Eucalyptus in large scale. In: Simpósio International Iufro, 2001, Valdivia. **Anais...** Valdivia, 2001. 16 p.

AMERSON, H.V., FRAMPTON, L.J., MCKEAND, S.E., MOTT, R.L.; WEIR, R.J. Loblolly pine tissue culture: laboratory, greenhouse and field studies. In: HENKE, R. R. et al. Tissue culture in forestry and agriculture. New York: **Plenum Press**, 1985. p. 271-288.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, n. 5, p. 353 - 359, 1999.

- BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças do Filoplano. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças**. Jaguariúna: Embrapa-cnpda, 1991. p. 33-52.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p. 343-350, 2001.
- BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes: In: AGUIAR, I.B. et al. Sementes florestais tropicais. Brasília: Abrates, 1993. p.83-135.
- BORGES N.J.; SOBORSA, R.C.; MARTINS-CODER, M.P. Multiplicação in vitro de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). Viçosa, Mg, **Revista Árvore**, v. 28, n. 4, p.493-498, 2004.
- BROWN, C. The global outlook for future wood supply from forest plantations. **Forestry Policy and Planning Division**. No. 3. FAO, Rome, 2000.
- BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). Lavras, **Ciência Agrotecnica**, n. , p.1403-1409, 2002. Edição Especial.
- BRUNETTA, J.M.F.C.; ALFENAS A.C.; MAFIA, R.G.; GOMES, J.M.; BINOTI, D.B.; NICOLAO, N.A. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, 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**, v.15, p.405-408, 1996.
- CAMPELLO, F. B. B. **Controle biológico de *Cylindrocladium scoparium* Morgan, agente causal do tombamento de mudas de *Eucalyptus* spp., com bactérias antagonistas**. 1992. 84f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1992
- CARNEIRO, J. S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 557-566, 1986.

CARVALHO, J.C. Ciência, tecnologia e política para a sustentabilidade florestal. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 4, p.4-5, dez. 2005. Disponível em: <[http://www4.esalq.usp.br/visaoagricola/docs/VA4\\_Forum.pdf](http://www4.esalq.usp.br/visaoagricola/docs/VA4_Forum.pdf)>. Acesso em: 16 de agosto de 2013.

DIAS, P.C.; PEREIRA M.S.F.; KASUYA, M.C.M.; PAIVA, H.N.; OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, v. 36, n. 6, p.1027-1037, 2012.

FERRAZ, H. G. M.; ROMEIRO, R. S.; GARCIAL, F. A. de O.; SOUZA, A. N. de. Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em função do modo de dispensa na planta. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 2, n. 2. p.33-37, 2008.

FREITAS, S.S.; VILDOSO, C.I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:987-994, 2004.

FOWLER, A. J. P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 27p. (Embrapa Florestas. Documentos, 40).

GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A.N.; MEDEIROS, A.C.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “in vitro” de brotações de *Eucalyptus dunnii* maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p.107-112, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, CNPH, 199º, 433p.

GOLLE, D. P.; REINIGER L. R. S.; CURTI, A. R.; HANAUER, J. G.; WALDOW D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação in vitro de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa , v. 34, n. 1, Feb. 2010 .

HAMANN, A. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. **Tree Physiology**, Victoria, v. 12, n. 3, p. 175-180, 1998.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS JÚNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice-Hall International, 1997. 770 p.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil: CIRCULAR TÉCNICA Nº 192. **Ipef**, 14 p., out. 2000.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolate of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.

KAGEYAMA, P.Y.; CASER, R.L. Adaptação de espécies de pinus na região nordeste do Brasil. **Série Técnica Ipef**, Piracicaba, v. 10, n. 3, p.33-56, jun. 1982.

KIJIMA, T.; YONAI, S.; OOHASHI, K.; AMAGAI, M. Process for biologically preventing dicotyledonous plant diseases using symbiotic bacteria. USA Patent No. 5.401.655(03-28-1995). 1995

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, n.1, p.39-44, 1989.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v. 71, n. 6, p.642-644, 1981.

LANA, R.M.Q.; LANA, A.M.Q.; BARREIRA, S.; MORAIS, T.R.; FARIA, M.V. Doses do ácido indolbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 3, p.13-18, Jul/Set. 2008.

LIMA, G.P.P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I.M.T.; CEREDA, M.P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* crantz cv mcol 22) cultivada *in vitro*. **R. Bras. Agrobiologia**, Pelotas, v. 8, n. 2, p.107-110, 2002

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International **Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, p. 1-25, 2004.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.63; p.541-556, 2009.

MAFIA, R.G. et al. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. *Rev. Árvore* [online]. 2009, vol.33, n.5 [cited 2015-01-28], pp. 789-797.

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, 2005.

MAFIA, R. G.; ALFENAS A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; SIQUEIRA, L. 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.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177. 1962.

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa em coníferas: perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e ambiente**, n. 1, p. 131-135, 1994.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala rw1. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p.1741-177, 1999.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das gimnospermas**. Santa Maria, 2. ed.: Ed. da UFSM, 161 p., 2005.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H. U. Avaliação de bactérias extremófilas facultativas na promoção do crescimento do híbrido "urograndis" de eucalipto, a partir de sementes. *Revista Árvore*, v.37, n.1, p.41-47, 2013.

MARQUES, E.; AQUILES, K. R.; BLUM, L. E. B. and UESUGI, C. H.. Bactérias extremófilas facultativas melhorando a germinabilidade de sementes de *Eucalyptus urophylla* S.T. blake. **Revista Árvore**. 2014, vol.38, n.3, pp. 489-494.

MELO, L. C.; OLIVEIRA, C. V. de; MANFREDI C.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. EFEITO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO ENRAIZAMENTO EM CLONE DE EUCALIPTO. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p.737-747, nov. 2012.

MOURA, E.F; MENEZES, I.C.; LEMOS, O.F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p.72-76, 2008.

NAVROSKI, Marcio Carlos. **MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE GENÓTIPOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; OTONI, W.C.; TEIXEIRA, J.B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *E. grandis* X *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, v. 35, n. 6, p.1207-1217, 2011.

OLIVEIRA, L. F. et al. Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. **Tree For Sci Biotech**, v. 6, n. 1, p. 96-101, 2012.

PRATHAP M.; RANJITHA KUMARI, B.D. A Critical Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 6, 2015. Acessado em 25/07/2015. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/open-access/a-critical-review-on-plant-growth-promoting-rhizobacteria-2157-7471-1000266.pdf>

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 269p, 2007.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de trichoderma spp. e ácido indol-3- butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Jorنال**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p.966-972, 2010.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.; BAKKER, P.; VAN PEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. **Plant and Soil**, New York, v.129, p.75-83, 1990.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SHIMIZU, J. Y. **Pinus na Silvicultura Brasileira**. 1ª Edição Colombo Pr: Embrapa Florestas, 2008. 223 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VASQUES, A. G.; NOGUEIRA, A.S.; KIRCHNER, F.F.; BERGER, R. Uma síntese da contribuição do gênero pinus para o desenvolvimento sustentável no sul do Brasil. **Floresta**, Curitiba Pr, v. 37, n. 3, p.445-450, setembro, 2007.

VESSEY, J. K. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p.571-586, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 2ª edição Viçosa, UFV, 2013. 279 p.

XAVIER, A.; SILVA, R. L. Evolução da silvicultura clonal de Eucalyptus no Brasil. **Agronomia Costarricense**, v. 34, n. 1, p.93-98, 2010.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Viçosa, v. 8, n. 1, p.189-194, jan/dez. 2001.