



**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL EM EUCALIPTO**

RAYKA KRISTIAN ALVES SANTOS

2019

RAYKA KRISTIAN ALVES SANTOS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção de título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira
Coorientadora: Prof. Dra. Vera Lúcia Divan Baldani

Vitória da Conquista
BAHIA-BRASIL
2019

S238i Santos, Rayka Kristian Alves.

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal em eucalipto. /Rayka Kristian Alves Santos, 2019.

103f.

Orientador (a): Dr. Joílson Silva Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia, Vitória da Conquista, 2019.

Inclui referência F. 100 – 103.

1. *Eucalyptus*. 2. Rizobactérias. 3. Adubação nitrogenada - *Eucalyptus urophylla*.
4. PGPR. I. Ferreira, Joílson Silva. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia. III. T.

CDD: 634.973766

Catálogo na fonte: Juliana Teixeira de Assunção – CRB 5/1890

UESB – Campus Vitória da Conquista - BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista - BA

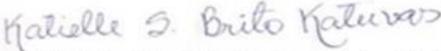
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRECIMENTO VEGETAL EM EUCALIPTO"

Autor: **Rayka Kristian Alves Santos**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA EM
AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:


Prof. Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB
(Presidente)


Prof. Katielle Silva Brito Kateivas, D.Sc., IFBaiano/ Itapetinga-BA


Prof. Felizarda Viana Bebé, D.Sc., IFBaiano/Guanambi-BA


Prof. Patrícia Anjos Bittencourt Barreto-Garcia, D.Sc., UESB


Pesq. Leandro Dias da Silva, D.Sc., PNP/CPES

Data de realização: 28 de fevereiro de 2019.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383
Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900

*'Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês', diz o Senhor,
planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês
esperança e um futuro.*

Jeremias 29: 11

*Ao meu pai Arnaldo (in memorian), à minha avó D. Leci (in memorian),
ao meu amigo Jouarlayne (in memorian), pessoas que me incentivaram a
chegar até aqui e que acreditaram muito na minha caminhada.
À minha mãe Railda, minha vida, razão de todo esse caminho;
Sem ela não estaria realizando este sonho e trilhando esta estrada.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre guiar meus passos pelos caminhos certos, iluminando-me e agraciando sempre minha vida com bênçãos, e por me segurar em seu colo em todos os momentos de minha vida;

À minha Nossa Senhora, por me fazer sentir sua filha protegida e amparada sempre;

À minha Mãe, minha Raíldinha, por todo amor, amizade e incentivo dedicados a mim e a minha caminhada acadêmica. Por todas as vezes que, mesmo sem saber, só demonstra atitudes que me fazem sempre buscar ser uma pessoa exatamente como ela é, e por nunca (nunca) medir esforços para me fazer bem e me ajudar a não desistir de meus sonhos;

Ao meu pai, José Arnaldo (*in memorian*), por todo amor que sempre me dedicou e por todo orgulho que tinha em dizer que eu era sua filha, essa vitória é para o senhor;

À minha vizinha D. Leci (*in memorian*), amor de minha vida, por todas as orações e por toda felicidade demonstrada com as minhas vitórias, por tudo que representa em minha vida, por todo amor dedicado à nossa família;

Aos meus irmãos Arnon, João, Ayrton (meus broudos), por toda companhia e cuidado com nossa mãe ao longo desses 11 anos em que não estive presente em casa, amo muito vocês e as nossas diferenças;

Às minhas primas Daya, Débora e Paula; aos meus primos Alysson e Deivid, às minhas tias Raquel e Antônia, por serem minha alegria constante, quando estou em casa, e por todo amor e apoio dedicado a mim nesta caminhada;

À minha avó D. Pedra e ao meu tio João Helson (Pim), Adélia, Alisson, Vitor Emanuel, Tio Rony, Emilia e Tia Duda, por todo carinho;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade de realização do curso e pela capacitação;

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudo e oportunidade de realizar meu Doutorado;

Ao professor Dr. Joilson Silva Ferreira, pela orientação, ensinamentos, apoio e paciência e, principalmente, ao amigo Joilson, por toda companhia, por todos os momentos de alegria que vivemos no ‘complexo de lazer’ e fora dele, e o carinho que tem comigo, sei que onde eu estiver poderei contar com você;

À professora e minha orientadora Dra. Vera Baldani, por todo aprendizado ao longo do Doutorado e por todas as conversas, conselhos, e por nos alegrar com sua presença, sempre que estava em Conquista;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UESB, pelo aprendizado e incentivos;

Ao professor Divino Miguel, pela concessão do laboratório de Microbiologia do Solo, possibilitando, assim, a realização de parte deste trabalho;

A todos os companheiros de longos ou curtos períodos no laboratório de Micro do Solo: Joelma, Cristina, Josi, Ingrid, Carol, Anne, Vinicius, Vitor, Danilo, Bruna e Mariana, agradeço principalmente à Joelma, por toda a paciência em passar seus ensinamentos sobre as bactérias diazotróficas;

À Cristina, pela amizade constante ao longo desses 6 anos, tivemos muitos momentos compartilhados de estudo, festas, alegrias e até separações, e por tudo que passamos; você é para mim a irmã que não tive.

Ao Renan e Monyelle, pela amizade que perdura desde 2013, quando cheguei em Conquista; os considero como irmãos, sei que sempre poderei contar com vocês em tudo;

Ao Gilmar e Mike, por toda amizade, alegria e encontros ao longo desses 6 anos em Conquista;

Aos amigos do meu grupo mais que especial “Topa Tudo”: Maida, Danilo, Elismar, Sarah e Paulo Monroe, por toda a amizade que construímos e os nossos encontros que tornaram meus dias cada vez melhores;

À Diretoria do Campo Agropecuário (DICAP) e toda a equipe de trabalhadores do campo, pelo apoio e serviços prestados, principalmente o Dui, por toda agilidade e ajuda em meus experimentos;

À UNESP – FCAV, campus Jaboticabal, principalmente aos professores Renato e Reinaldo, pela oportunidade em realizar o Doutorado Sanduíche e meu trabalho de Qualificação, através do Programa Procad;

Às meninas da República Coronelas em Jaboticabal e à Julieta (a cachorra mais esperta e companheira do mundo), o meu período de estágio foi bem melhor com a presença de vocês;

Aos colegas de turma, caminhamos e aprendemos juntos ao longo desses seis anos ou por parte desse período: Dena, Arlete, Geraldo, Romário, Gisele, Patrick, Renan, Aderson, Aldo, Cristina, Joelma, Fabiano, Bira, Léo, Greice, Jennifer, John, Josi, Anne, Breno, Alex, Roberlan, Bismarck, André, Maida, Danilo, Elismar, Flávia, Ariane, Walleska e Vinicius;

À Lua (minha cachorra), melhor coisa que me aconteceu em 2018, te adotar encheu minha vida de alegria, minha eterna companheira; e a Fred (meu cachorro em Montes Claros), que me enche de alegria sempre que estou em casa; a companhia de vocês me fez passar por esse período mais aliviada;

E não menos importante, à cultura do Eucalipto, que conheci na época do mestrado e me apaixonei por ela, e também por meus isolados bacterianos “minhas filhas”, que me renderam dias de felicidade, quando eu via que estavam crescendo e dando respostas promissoras em um trabalho inédito na nossa região;

A essa moça que aqui escreve, que desde criança sonhava em ser professora, e através do curso de Agronomia, que conheceu por acaso, se apaixonou ainda mais pela academia; e depois de 11 anos está cada vez mais perto do seu objetivo, com muito orgulho de todo caminho trilhado até aqui;

Aos professores participantes da minha banca de Tese de Doutorado, a escolha de cada um de vocês foi ímpar, pois eu sabia que poderiam colaborar muito com meu trabalho;

Aos integrantes dos grupos de Bolsistas Fapesb e Bolsistas Capes (do Facebook), no qual compartilhamos nossas preocupações, alegrias, angústias e tristezas ao longo desse caminho; é sempre bom saber que não estamos sozinhos nessa jornada;

A todos que, de alguma forma, me ajudaram ao longo desse caminho e que torceram por minha vitória.

RESUMO GERAL

SANTOS, R. K. A. **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM EUCALIPTO**. Vitória da Conquista – BA: UESB, 2019. (Tese – Doutorado em Agronomia: Área de concentração em Fitotecnia) *.

O eucalipto é uma cultura de grande importância econômica, devido à sua vasta diversidade em matéria prima e uso para fabricação de produtos essenciais. Dessa forma, produtos e inovações que facilitem e otimizem sua produção são sempre necessários. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) atuam auxiliando no desenvolvimento destas e, por serem uma opção econômica e sustentável, elas vêm sendo empregadas em diversas culturas com resultados positivos. Por esses motivos, devem ser estudados e elucidados os mecanismos de promoção de crescimento na cultura do eucalipto. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar morfológica e fisiologicamente, e selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal na cultura do eucalipto. No artigo 1, foi realizado o isolamento de bactérias, obtendo 19 bactérias de *Eucalyptus urophylla* e *urograndis*, dos clones AEC144 e 1528, respectivamente, tanto de mudas quanto de plantas de diferentes idades, totalizando, assim, 3 experimentos de isolamento. Nessa primeira etapa, também foi realizada a caracterização morfológica dos isolados e caracterização fisiológica quanto à produção de compostos indólicos e à fixação biológica de nitrogênio. No artigo 2, foram realizados 2 experimentos de seleção das bactérias, buscando avaliar os isolados que auxiliaram no crescimento das plantas. No artigo 3, foi realizado um experimento com presença e ausência de sulfato de amônio com os isolados que se destacaram nos experimentos de seleção, buscando identificar os isolados que foram mais eficientes em absorver e disponibilizar o nitrogênio para as plantas, e que ainda proporcionaram um desempenho satisfatório ao crescimento. Por último, o artigo 4 apresentou aqueles isolados que contribuíram mais eficazmente ao longo de todos os experimentos para o crescimento das plantas e uma mistura deles, buscando esclarecer o papel isolado e em conjunto dessas bactérias, associadas a níveis de nitrogênio. Ao longo desses 4 artigos, foi possível esclarecer a ação de bactérias que promovem o crescimento na cultura do eucalipto e estudar sua associação com o nitrogênio, por ser o nutriente mais requerido pela maioria das culturas, com um custo oneroso, e que causa vários transtornos ao meio ambiente, percebendo, por conseguinte, o quanto é essencial o estudo de alternativas ecológicas e sustentáveis.

Palavras-chave: PGPR; *Eucalyptus*; rizobactérias; adubação nitrogenada.

*Orientador: Joilson Silva Ferreira, UESB.

ABSTRACT

SANTOS, R. K. A. **ISOLATION, CHARACTERIZATION AND SELECTION OF BACTERIALS PROMOTING VEGETABLE GROWTH IN EUCALYPTUS**. Vitória da Conquista - BA: UESB, 2019. (Thesis - Doctorate in Agronomy: Area of concentration in Plant Science) *.

Eucalyptus is a crop of great economic importance due to its wide diversity in raw material and use for the manufacture of essential products. In this way products and innovations that facilitate and optimize their production is always necessary. Plant growth promoting bacteria (BPCP) act as aids in the development of plants, and since they are an economical and sustainable option, they have been used in several crops with positive results, and for these reasons must be studied and elucidated their mechanisms of promotion of growth in eucalyptus culture. The objective of this work was to isolate, characterize morphologically and physiologically, and select plant growth promoting bacteria in eucalyptus culture. In the first article, bacterial isolation was obtained, obtaining 19 bacteria of *Eucalyptus urophylla* and *urograndis*, clones AEC144 and 1528, respectively, of both seedlings and plants of different ages, thus totaling 3 isolation experiments. In this first stage, the morphological characterization of the isolates and physiological characterization of the production of indole compounds and the biological fixation of nitrogen were also performed. In article 2, two experiments were carried out to select the bacteria, in order to evaluate the isolates that aided the growth of the plants. In the article 3, an experiment was carried out with the presence and absence of ammonium sulphate with the isolates that stood out in the selection experiments, in order to identify the isolates that were more efficient in absorbing and making available the nitrogen to the plants and that still provided a performance satisfactory to growth. Finally, article 4 presented those isolates that contributed most efficiently throughout all the experiments to the growth of the plants and a mixture of them, seeking to clarify the isolated and joint role of these bacteria associated with nitrogen levels. Throughout these four articles, it was possible to clarify the action of bacteria that promote growth in eucalyptus culture. To study its association with nitrogen, since this is the nutrient most required by most crops and at a costly cost, and that causes several disorders to the environment, therefore the study of ecological and sustainable alternatives are essential.

Keywords: PGPR; Eucalyptus; rhizobacteria; nitrogen fertilization.

* Adviser: Joilson Silva Ferreira, DSc. UES

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – População de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de eucalipto em diferentes genótipos de eucalipto.....40

Tabela 2 – Isolados bacterianos associados a mudas e plantas de diferentes genótipos de eucalipto41

Tabela 3 – Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos de eucalipto, quanto à produção de compostos indólicos e à fixação biológica qualitativa de nitrogênio43

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Altura, diâmetro, índice de robustez, número de folhas do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla* sob à inoculação de isolados bacterianos60

Tabela 2 – Altura, diâmetro, índice Spad, número de folhas, número de brotações, índice de robustez, massa seca de parte aérea do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla* sob à inoculação de isolados bacterianos63

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Resumo da análise de variância, em relação às avaliações de Altura (ALT), diâmetro (DIA), área foliar (AFO), massa seca de parte aérea (MPA), índice SPAD (SPAD), fotossíntese (FOT) e nitrogênio total (NTOT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada.....75

Tabela 2 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), área foliar (AFO), massa seca de parte aérea (MPA), índice SPAD (SPAD), fotossíntese (FOT), nitrogênio percentual (N%) e nitrogênio total (NTOT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos76

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Resumo da análise de variância, em relação às avaliações de altura (ALT), diâmetro (DIA), número de brotações (BROT), massa seca de parte aérea (MPA), massa seca de raiz (MRA), razão massa seca de raiz e parte

aérea (MPARA) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos, associado à adubação nitrogenada.....95

Tabela 2 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), número de brotações (BROT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e mistura de rizobactérias.....96

Tabela 3 – Massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, razão massa seca de parte aérea sobre massa seca de raiz do clone AEC 144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e mistura de rizobactérias 97

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Dendograma de similaridade de isolados bacterianos de eucalipto.....45

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Altura e diâmetro de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados bacterianos UESBJMR32E e UESBJMR5E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio.....77

Figura 2 – Área foliar de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados UESBJNR32E, UESBJMR32E e UESBJMR5E associados a diferentes níveis de sulfato de amônio.....79

Figura 3 – Massa seca de parte área de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados UESBJMR32E e UESBJMR5E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio.....80

Figura 4 – Índice Spad de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados UESBJMR5 e UESBJMR32E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio.....81

Figura 5 – Nitrogênio total em *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com o isolado UESBJNR32E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio82

Figura 6 – Fotossíntese em *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com a bactéria AM82 e com tratamento controle, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio.....83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
Al	Alumínio
ALT	Altura
ARFO	Área foliar
AIA	Ácido indol-3-acético
BPCP	Bactéria promotora de crescimento de plantas
BROT	Número de brotações
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CV	Coeficiente de variação
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DIA	Diâmetro de colo
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária
FOT	Fotossíntese
g	grama
IRGA	Analisador de gases por infravermelho
MPA	Massa seca de parte aérea
MPARA	Relação entre massa seca de parte aérea e de raiz
MRA	Massa seca de raiz
MO	Matéria orgânica
N%	Nitrogênio percentual
Ntot	Nitrogênio total
NUF	Número de folhas
Rubisco	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
S	Enxofre
SPAD	Intensidade da coloração verde das folhas (Soil Plant Analysis Development)
V	Saturação de base
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
u.f.c	Unidade formadora de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i>	19
2.1.1 <i>Eucalyptus urophylla</i>	20
2.1.2 <i>Eucalyptus urograndis</i>	21
2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	21
2.2.1 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal	21
2.3 Crescimento inicial de plantas de eucalipto e os benefícios de bactérias promotoras do crescimento vegetal	23
3 REFERÊNCIAS	24

CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ASSOCIADAS A DIFERENTES GENÓTIPOS DE EUCALIPTO

RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Caracterização morfológica	37
2.2 Caracterização fisiológica	37
2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio	37
2.2.2 Produção de Ácido índol acético (AIA)	38
2.3 Quantificação da população bacteriana final dos isolados	38
2.4 Análise estatística	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Isolamento bacteriano em diferentes genótipos	39
3.2 Caracterização fisiológica dos isolados	43
3.3 Dendograma de similaridade dos isolados bacterianos	44
4 CONCLUSÕES	47
5 REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM EUCALIPTO EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO	55
ABSTRACT	55
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Primeiro experimento de seleção de isolados bacterianos	57
2.2 Segundo experimento de seleção de isolados bacterianos	58

2.3 Análise estatística	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 Primeiro experimento de seleção	60
3.2 Segundo experimento de seleção	62
4 CONCLUSÕES	65
5 REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO III – BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM *Eucalyptus urophylla*

RESUMO	70
ABSTRACT	70
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4 CONCLUSÕES	84
5 AGRADECIMENTOS	85
6 REFERÊNCIAS	85

CAPÍTULO IV – DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO ASSOCIADAS À RIZOBACTÉRIAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA

RESUMO	91
ABSTRACT	91
1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4 CONCLUSÕES	99
5 REFERÊNCIAS	99

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* é pertencente à família Myrtaceae (sub-família das Leptospermoideae), gênero que compreende mais de 700 espécies e apresenta grande capacidade de adaptação e, por este motivo, foi amplamente difundido na região dos trópicos. A área plantada com eucalipto no Brasil é de 5,7 milhões de hectares, sendo que o estado da Bahia apresenta um plantio de 612 mil hectares (IBÁ, 2017).

Atualmente diversos estudos vêm sendo realizados, focados no desenvolvimento sustentável e ecológico das culturas, visando principalmente à redução do uso de produtos químicos, que são utilizados para favorecer o desenvolvimento das plantas e o controle de doenças e pragas.

Visando atingir um padrão de qualidade para as mudas e o aumento de produtividade, diversos produtos como reguladores vegetais (hidrogel, bioestimulantes dentre outros) são testados com a mesma finalidade. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) necessitam ser estudadas na cultura do eucalipto.

Segundo Brown (1974), o uso de fertilizantes bacterianos não simbiotes começou a ser empregado no final do século XIX (1885), na antiga União Soviética e, em 1958, foram utilizados cerca de 10^7 ha desses fertilizantes, em 50-70% das principais culturas, propiciando um incremento de 10-20% na sua produtividade.

Entretanto, somente a partir do final da década de 1970, no Brasil, no antigo Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS), hoje Embrapa Agrobiologia, é que surgiram trabalhos com soja que apontaram, de forma consistente, o papel das rizobactérias, e procuraram elucidar seus mecanismos de ação (FALEIRO e outros, 2011).

As bactérias promotoras de crescimento têm se mostrado bastante eficientes por suas funções de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, na produção de 1- aminociclopropano- 1-

carboxilato (ACC) deaminase em situações de estresse, ou agirem indiretamente por meio do controle biológico de patógenos, sendo por competição de espaço e nutrientes, ou atuando na indução de resistência sistêmica no hospedeiro.

Embora já exista um vasto conhecimento sobre a ação e benefícios dessas bactérias em diversas culturas (TORRES e outros 2012; GOVINDARAJAN e outros 2008; SOUZA e outros 2013; TORTORA e outros 2011; SUN e outros 2009; FARINA e outros 2012; CHEN e outros 2014), para o eucalipto esse conhecimento ainda é insipiente.

A interação entre planta e microrganismo é muito importante, pois orienta diversas rotas do crescimento de ambos indivíduos, e o uso de BPCP's resulta em uma simbiose bastante eficiente. Dessa forma, as características que norteiam essa associação devem ser estudadas para ter um conhecimento amplo da ação das bactérias e a resposta das plantas.

Para o eucalipto, existem alguns raros trabalhos de isolamento inicial de bactérias ou testes com o mesmo produto comercial, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a interação com genótipos e clones diferentes, em diferentes ambientes, buscando conhecer melhor essa população de bactérias e o seu comportamento nessa cultura.

Mediante o exposto, e em vista dos benefícios do uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, este trabalho teve o objetivo de isolar, caracterizar morfológica e fisiologicamente, e estudar a associação dessas bactérias em casa de vegetação e em ambiente aberto com mudas de eucalipto, identificando os possíveis benefícios ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, possui cerca de 700 espécies descritas e tem sido uma grande alternativa ao uso da madeira nativa na produção madeireira no Brasil. Isso se dá principalmente em razão do seu rápido crescimento e da alta produtividade (RAMOS e outros, 2011).

O plantio de *Eucalyptus* sp. foi introduzido no Brasil em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade, junto à Companhia Paulista de Estradas de Ferro, em São Paulo. Mas as plantações em larga escala tiveram impulso a partir da década de 1960, e se intensificaram em 1970, com programas de incentivo fiscal aos plantios florestais associados aos investimentos das indústrias de papel e celulose e siderurgia, e programas de melhoramento genético e tecnologia de propagação clonal do eucalipto, responsável por alta produtividade alcançada pelo gênero (ABRAF, 2007).

O clima favorável do Brasil e o avanço alcançado pelas pesquisas e tecnologia florestal permitem que o eucalipto possa ser colhido num prazo de cinco a sete anos para a produção de celulose, quando atinge até 35 metros de altura, e produtividade que supera $50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (BAESSO e outros, 2010).

Atualmente a área plantada com eucalipto no Brasil é de 5,56 milhões de hectares, sendo que o estado da Bahia apresenta um plantio de 630 mil hectares (IBÁ, 2015).

O gênero *Eucalyptus* se apresenta como matéria-prima de uso múltiplo, pois, além da utilização para a celulose e papel (GOMIDE e outros, 2010), outras aplicações foram agregadas, como o seu uso nas formas de madeira sólida serrada e chapas (MESQUITA e outros, 2006), energia (ARAÚJO e outros, 2010), além da produção de óleos essenciais (VIVAN e outros, 2011). Sua madeira tem sido utilizada em laminação, componentes estruturais para construção, caixotaria, mourões, escoras, celulose e papel, chapas duras, painéis, lenha e carvão (REMADE, 2001).

No Brasil, as espécies mais cultivadas são: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. paniculata*, *E. pilularis*, *E. saligna*, *E. staigeriana*, *E. urophylla*, e híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* (WILCKEN e outros, 2008).

2.1.1 *Eucalyptus urophylla*

O *Eucalyptus urophylla* S.T Blake é uma espécie originária da Indonésia e do Timor, introduzido no Brasil por Edmundo Navarro de Andrade antes de 1909 com o nome de *E. alba*, sendo considerada uma espécie que apresenta alta estabilidade genética e com potencial para reflorestamento.

É considerada uma espécie com forte dominância apical, que responde ao espaçamento e à adubação e possui resistência ao déficit hídrico, tornando, assim, uma espécie importante para os programas de melhoramento genético (FERREIRA, 1992).

Apresenta resistência ao cancro do eucalipto e à ferrugem do eucalipto; tem sido utilizada como obra prima para produção de carvão, celulose, painéis de fibras, serraria, postes e dormentes.

O genótipo AEC 144 de *E. urophylla* dentre os clones plantados é o mais utilizado, desenvolvido pela empresa mineira Arcelormital. É um *urophylla* espontâneo com densidade de 515 kg m³, muito utilizado no Brasil como biomassa e matéria prima em serrarias (PORTAL FLORESTAL, 2017),

este clone vem se destacando na região sudoeste baiana devido sua boa adaptação as condições climáticas de plantio.

2.1.2 *Eucalyptus urograndis*

O *E. urograndis* é um híbrido resultante do *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*. O objetivo do cruzamento dessas duas espécies é obter plantas com um bom crescimento, uma vez que as características do *E. grandis* é um leve aumento na densidade da madeira e melhorias no rendimento; sendo que as propriedades físicas da celulose são características do *E. urophylla*.

Esse híbrido apresenta uma ótima resistência à deficiência hídrica, lembrando que, em solos pobres e, principalmente, deficientes de boro, há necessidade de pequena adubação. A madeira é considerada moderadamente leve, com cerne diferenciado, sua regeneração ocorre através da brotação de cepas, e é considerada boa.

Apresenta usos múltiplos, como papel e celulose, carvão vegetal, serraria em geral, construção civil, móveis, pontaletes, postes, lenha.

Um dos clones do híbrido *E. urophylla x E.grandis* é o clone AEC 1528 de procedência mineira, desenvolvido pela empresa Arcelomital, e considerado um genótipo tolerante ao psilídeo de concha, à ferrugem do eucalipto e indicado para regiões com baixo déficit hídrico (RS FLORESTAL, 2015). Por possuir uma densidade base de 531 kg m³, sua madeira pode ser utilizada para energia na forma de lenha, carvão e cavaco, para serraria, e como madeira tratada na forma de estacas, mourões e postes (RS FLORESTAL, 2015).

2.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal

2.2.1 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal

O termo 'rizobactérias' implica um grupo de bactérias da rizosfera, competentes em colonizar o ambiente radicular (KLOEPPER e outros, 1996).

Atualmente tem-se utilizado o termo Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas- RPCP ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR, termo inicialmente utilizado para descrever bactérias benéficas, bem adaptadas às raízes das plantas (KLOEPPER; SCHORTH, 1978) e para diferenciá-las das bactérias do solo, que não colonizam ou não o fazem tão agressivamente (ZAGO e outros, 2000).

Essas bactérias podem ser isoladas tanto diretamente do solo, assim como do interior das plantas (PAZ, 2009), ou mesmo do rizoplane (LEMOS, 2009).

Segundo Barea e outros (2005), existe três características intrínsecas de uma RPCP, sendo elas: boa colonizadora de raízes; capaz de sobreviver e se multiplicar em habitats associados com a superfície das raízes em competição com outros microrganismos pelo menos o tempo necessário para promover o crescimento de plantas ou a proteção de doenças; e por último ser capaz de promover o crescimento de plantas.

De acordo com Somers e outros (2004), as RPCP também podem ser caracterizadas por suas atividades funcionais, tais como: (i) biofertilizantes (aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta), (ii) fitoestimulantes (devido à promoção de crescimento de plantas, geralmente através de hormônios), (iii) rizoremediadores (devido à degradação de poluentes orgânicos) e (iv) biopesticidas (pelo controle de doenças, principalmente pela produção de antibióticos e antifúngicos metabólitos) (ANTOUN; PRE'VOST, 2005).

Segundo vários autores, a utilização desses microrganismos que promovem o crescimento de plantas pode ser ambientalmente preferível devido à redução do uso de fertilizantes e pesticidas e devido ao menor custo e tempo para aquisição de respostas positivas (CATTELAN; GRASSANO, 2007; AVIS e outros, 2008; SOLANO e outros, 2008).

2.3 Crescimento inicial de plantas de eucalipto e os benefícios de bactérias promotoras de crescimento vegetal

Diversos entraves dificultam a produção inicial de mudas de eucalipto, como a deficiência hídrica na fase de estabelecimento, uso ou não de reguladores vegetais que auxiliem no processo, ação de patógenos, má formação do sistema radicial, acarretando em má formação das mudas, sendo este um dos principais problemas, pois irá interferir no desempenho no campo das plantas.

Todos esses problemas acentuam os custos de produção, sendo necessários estudos que visem aquisição de insumos agrícolas que ajudem a favorecer o estabelecimento inicial das mudas em viveiros, acarretando, assim, em maior homogeneidade das mudas no campo.

Nas últimas décadas, tem se investido muito em pesquisas para disponibilizar formas alternativas de nutrientes às plantas, e em metodologias alternativas de controle de patógenos, com enfoque no uso de microrganismos (KUSS e outros, 2007; BARROSO; NAHAS, 2008; RYAN e outros, 2008; LUCON e outros, 2009).

Esses microrganismos vêm despertando atenção, devido à necessidade de reduzir o uso de produtos químicos, num contexto de agricultura sustentável e atenta à proteção ambiental (SOUZA, 2001; COMPANT e outros, 2005; SOUZA e outros, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que esses microrganismos têm sido muito eficientes na fixação biológica de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005), solubilização de fosfato (RODRIGUEZ e outros, 2006), produção de hormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas (CASSÁN e outros, 2009), ou agirem indiretamente por meio do controle biológico de patógenos (ASSUMPCÃO e outros, 2009), sendo por competição de espaço e nutrientes ou atuando na indução de resistência sistêmica no hospedeiro. Podem ainda, ser fonte de novos compostos químicos e biológicos, com propriedades antimicrobianas e de ampla utilização industrial (STROBEL, 2003).

A colonização dessas bactérias promove efeitos marcantes na morfologia das raízes, devido à liberação dos hormônios, alterando a densidade e comprimento dos pelos radiculares, resultando no aumento do sistema radicular e, assim, maior exploração do solo e seus nutrientes (SOLANO e outros, 2008).

Estudos com bactérias promotoras de crescimento em arbóreas são pouco conhecidos, especificamente em eucalipto, contudo, os estudos encontrados foram com clones de “urograndis” e estudando produtos comerciais (MAFIA, 2007; MAFIA, 2009; ZARPELON 2007; PAZ, 2009; TEIXEIRA 2007).

Dessa forma, pode-se observar a importância de se estudar a caracterização dessas bactérias em Eucalyptus e também na região do sudoeste baiano, onde este cultivo vem crescendo consideravelmente, devido às condições favoráveis para a cultura.

3 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2007 ano base 2006**. Brasília: ABRAF, 2007. 80 p.

ASSUMPCÃO, L. C.; LAÇAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

ANTOUN, H.; PREVOST, D. **Ecology of plant growth promoting rhizobacteria**. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*, Springer, Dordrecht, p. 1–38. 2005.

ARAÚJO, A. R. A.; FONSECA, F. S. T.; HENDGES, T. L. Análise de viabilidade econômica da produção de eucalipto na cidade de Balsas- MA para

a geração de energia. **Revista Científica Faculdade de Balsas**, n. 1, p. 1- 21, 2010.

AVIS, T. J.; GRAVEL V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.40, n.7, p.1733–1740, 2008.

BAESSO, R. C. E.; RIBEIRO, A.; SILVA, M. P. Impacto das mudanças climáticas na produtividade do eucalipto na região norte do Espírito Santo e sul da Bahia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 2, p. 335-344. 2010.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579. 2005.

BAREA, J.; POZO, M. J.; AZCON – AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 529-535, 2008.

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.181-197, 1974.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and

early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.45, n.1, p.28–35, 2009.

CATTELAN, A. J.; GRASSANO, A. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculante, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal. In: CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE)**. Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSO, 2007, p.154-173. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 290).

CHEN, Y.; FAN, J. B; DU, L.; XU, H.; ZHANG, Q. Y; HE, Y.Q. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v.84, p. 235-244. 2014.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.

FARINA, R. A.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S. B.; LISBOA, B. B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p. 44-52. 2012.

FERREIRA, M. Melhoramento e silvicultura clonal. **IPEF**, Piracicaba, n. 45, p. 22-30, 1992.

GOMIDE, J. L.; FANTUZZI NETO, H.; REGAZZI, A. J. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 2, p.339-344. 2010.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S.W.; WEON, H.Y; LAKSHMINARASIMHAN C. Effects of the inoculation of Burkholderia vietnamensis and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, p.21-37. 2008.

IBÁ, **Indústria Brasileira de árvores, Ano base 2014**. 80p. Disponível em: <http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf> visitado em 01/05/2018.

IBÁ, **Indústria Brasileira de árvores, Relatório 2017**. 80p. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf> visitado em 20/11/2018.

KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. 2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France, p. 879–882.1978.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v.46, n.6, p.406-409, 1996.

KUSS, A.V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L.Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

LEMOS, M. T. O. **Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil**. 2009. 72f. Dissertação

(Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2009.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C.M.; ISHIKAWA, A.I.; PATRÍCIO, F.R.A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 225-232, 2009.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; et al. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.789-797, 2009.

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

MESQUITA, J. B.; LIMA, J. T.; TRUGILHO, P. F. Microbiota associada à madeira serrada de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden durante a secagem ao ar livre. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 45-50, 2006

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PORTAL FLORESTAL. **Mudas clonadas de eucalipto**. Disponível em: < http://www.portalflorestal.com.br/construcoes_detalhes.php?con_id=10 >. Acesso em: 20/08/2017.

RAMOS, L. M. A.; LATORRACA, J. V. de F.; PASTRO, M. S.; SOUZA, M. T. de; GARCIA R. A.; CARVALHO, A. M. de. Variação radial dos caracteres

anatômicos da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden e idade de transição entre lenho juvenil e adulto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 92, p. 411-418, dez. 2011.

REMADE, **Revista da Madeira**. Ano 11 - n. 59, setembro de 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br>, Acesso em: 12/08/2016.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant Soil**, v. 102, p.15-21. 2006.

RS FLORESTAL. **Clone AEC 1528**. Disponível em: <http://www.rsflorestal.com.br/site/2013/06/04/clone-aec-1528-super-clone/>. Acesso em: 25/06/2015.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Ireland, v. 278, p. 1–9, 2008.

SOLANO, B. R., BARRIUSO, J. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, p.41-54.2008.

SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J., SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. **Crit. Revista Microbiologia** 30, 205–240. 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 195-203, 2009.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia**, n. 21, p. 28-31, 2001.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P. B.; MEYER, J.; VARGAS, L. K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L. M. P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant Soil**, v.366, p. 585-603. 2013

SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growthpromoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters**, v.296, p.131-136. 2009.

TEIXEIRA, D. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; FERREIRA, E. M.; SIQUEIRA, L.; MAFFIA, L. A.; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.118-123, 2007.

TORRES, A. R.; KASCHUK, G.; SARIDAKIS, G. P.; HUNGRIA, M. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean *Glycine max* (L.) Merrill. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1831-1835. 2012.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R.O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v.193, p. 275-286. 2011.

VIVAN, G. A.; BARBOZA, F. da S.; LUZ, M. L. S. da.; LUZ, C. A. S. da.; RAMIREZ, O. P.; GOMES. M. C.; SOARES, F.C. Estudo técnico e econômico de um sistema móvel de extração de óleo essencial de eucalipto. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 23-31, 2011.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. **Pseudonomas spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus® no enraizamento e crescimento do eucalipto**. 2007. 82f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

WILCKEN, C. F.; LIMA, A. V.; DIAS, T. R.; MASSON, M. V.; POGETTO, M. H. **Guia prático de manejo de plantações de eucalipto**. 2008. 19 p. UNESP, São Paulo.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ASSOCIADAS A DIFERENTES GENÓTIPOS DE EUCALIPTO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ASSOCIADAS A DIFERENTES GENÓTIPOS DE EUCALIPTO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias associadas à raiz e folhas de diferentes genótipos e clones de Eucalipto. O trabalho foi realizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no laboratório de Microbiologia do Solo, onde foram realizados três isolamentos: o primeiro com mudas com idade de 100 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144; o segundo com plantas de 190 dias dos clones AEC144 (*E. urophylla*) e 1528 (*E. urograndis*); e o terceiro isolamento com plantas de 130 dias de *E. urophylla* clone AEC144. Para o isolamento das bactérias, amostras de 10g de raiz com solo aderido e folha, foram coletadas, trituradas em 90 mL de solução salina, e depois realizada diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-7} . De cada uma das diluições, alíquotas de 100 μ L, foram colocadas em triplicata em frascos de penicilina de vidro contendo os meios semissólidos isentos de nitrogênio: NFb, JNFb, JMV, LGI. A quantificação das bactérias presentes nos meios de cultivo foi realizada pela técnica do número mais provável (NMP). Realizou-se também a caracterização morfológica das colônias e a caracterização fisiológica quanto à produção de compostos indólicos e fixação biológica de nitrogênio de forma qualitativa. E, posteriormente, os isolados foram agrupados em um dendograma de similaridade a fim de observar o quanto se assemelhavam aos padrões dos gêneros de *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum amazonense*. Ao final do experimento, foi obtido um total de 19 isolados bacterianos, sendo 13 de raiz e 6 de folha. Em relação à avaliação fisiológica, todos os isolados produziram compostos indólicos e somente 9 apresentaram a película aerotóxica, que caracteriza a fixação biológica de nitrogênio de forma qualitativa nos meios semisseletivos. E, por fim, o dendograma de similaridade agrupou um número maior de isolados como semelhantes ao gênero *Azospirillum*.

PALAVRAS-CHAVE: Eucalyptus; rizobactérias; FBN; auxina.

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate and characterize bacteria associated with roots and leaves of different genotypes and Eucalyptus clones. The work was carried out at the State University of Southwest of Bahia (UESB), in the soil microbiology laboratory, three isolations were carried out, the first with 100 day old *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 seedlings, the second isolation with plants with age 190 days with clones AEC144 (*E. urophylla*) and 1528 (*E. urograndis*), the third isolation with 130 days of *E. urophylla* clone AEC144. For the isolation of the bacteria, samples of 10g of root with adhered soil and leaf were collected, crushed in 90 mL of saline solution and serial dilution of 10⁻² to 10⁻⁷. From each of the dilutions, 100 µL aliquots were placed in triplicate in glass penicillin flasks containing the nitrogen-free semi-solid media: NFb, JNFb, JMV, LGI. Quantification of the bacteria present in the culture media was performed by the most probable number technique (MPN). The morphological characterization of the colonies and the physiological characterization of the production of indole compounds and biological nitrogen fixation were performed qualitatively. Later, the isolates were grouped in a dendrogram of similarity to observe how much they resembled the standards of the genera of *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* and *Azospirillum amazonense*. At the end of the experiment a total of 19 bacterial isolates were obtained, 13 of root and 6 of leaf, in relation to the physiological evaluation, all the isolates produced indolic compounds and only 9 presented the aerotaxic film that characterizes the biological fixation of nitrogen form qualitative analysis in the semi-intelligible media. And finally the similarity dendrogram, grouped a greater number of isolates as similar to the genus *Azospirillum*.

KEYWORDS: Eucalyptus; rhizobacteria; FBN; auxin.

1 INTRODUÇÃO

A simbiose que ocorre entre a planta e as bactérias benéficas do solo, aqui tratadas como Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) ou PGPB, ou PGPR do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria/Rhizobacteria*, ocasionam grandes benefícios para a planta, como a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005; IKEDA e outros 2013), solubilização de fosfato (GRANADA e outros, 2013), produção de sideróforos (AMBROSINI e outros 2012; SOUZA e outros 2013), produção de hormônios como auxinas (SPAEPEN e outros 2008; BAUDOIN e outros 2010), giberelinas e citocininas (CASSÁN e outros, 2009) a produção de ACC deaminase em situações de estresse (SUN e outros 2009; BAL e outros 2013), ou ação direta por meio do controle biológico de patógenos.

Conhecer a população de bactérias benéficas associadas à cultura que está sendo estudada é essencial, pois, assim, é possível mensurar em qual etapa do crescimento da planta essas bactérias estarão interferindo, e quais bactérias serão utilizadas para determinados processos.

Nesse contexto, a etapa de isolamento e caracterização dessas bactérias faz-se necessário, pois cada cultura tem um grupo de bactérias que preferencialmente se associam a ela, seja pelo tipo de exsudato produzido, pH, aeração, componentes químicos do solo ou outras populações microbianas que se encontram aderidas àquela planta.

O eucalipto é uma cultura com grande importância econômica, principalmente por sua grande diversidade de produtos (REMADE, 2001; GOMIDE e outros, 2010; ARAÚJO e outros, 2010; VIVAN e outros, 2011).

Entretanto, a maioria de pesquisas relacionadas à cultura é sobre a produção de mudas comerciais, com pouca atenção ao papel da biota do solo, área em que as bactérias estão incluídas, e a importância e possibilidade de benefícios que elas podem oferecer à cultura, não somente na fase de viveiro.

O estudo das BCPS's, em diversas culturas, tem apresentado resultados interessantes e promissores (FERREIRA e outros, 2013; BAO e

outros, 2013; SHARMA e outros, 2013; UPADHYAY e outros 2012, HUNGRIA e outros, 2010), entretanto, para o eucalipto, esses estudos são bastantes superficiais e se limitam ao uso de produtos já presentes no mercado.

Em vista disso, são necessárias pesquisas que busquem explorar mais o estudo da diversidade e funções dessas bactérias que, possivelmente, são influenciadas pelos genótipos na cultura do eucalipto.

Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar morfológica e fisiologicamente, e avaliar a similaridade de bactérias promotoras de crescimento de plantas em diferentes genótipos e clones de plantas de eucalipto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo da UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde foram realizados três experimentos de isolamento de bactérias na cultura do eucalipto.

O primeiro experimento teve início em 03 de dezembro de 2015, quando foram utilizadas mudas de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 com idade de 100 dias; o segundo foi realizado em 21 de fevereiro de 2016, com plantas com idade de 190 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 e *E. urograndis* clone 1528; e o terceiro foi realizado em 18 de agosto de 2016, com plantas com idade de 130 dias de *E. urophylla* clone AEC144.

O processo de isolamento das bactérias foi realizado igualmente para todos os três experimentos, então, as mudas e plantas de eucalipto foram desinfestadas superficialmente em água corrente e, em seguida, com água destilada, para eliminação dos resíduos do solo. As plantas foram separadas em raiz e parte aérea. As amostras foram fragmentadas pesando-se 10g. Em seguida, foram trituradas em liquidificador com 90 mL de solução salina, a fim de obter uma solução na concentração 10^{-1} .

Posteriormente, realizaram-se diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-7} , transferindo-se 1 mL da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio

contendo 9 mL de solução salina. Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 5 mL dos meios semissólidos livres de nitrogênio (N): JNFb para *Herbaspirillum spp.*, NFb para *Azospirillum spp.* JMV para *Burkholderia spp.*, LGI para *A. amazonense*.

Os frascos foram incubados a 30°C, por cinco dias, após esse período, foram considerados positivos para contagem aqueles que desenvolveram uma película aerotóxica típica, próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER e outros, 1995).

Os meios que formaram películas características foram repicados para novos meios semissólidos, até formação de nova película. Em seguida, foram riscadas em placas de Petri, em meios sólidos específicos e em meio sólido batata, incubadas em estufa a 30°C, por cinco dias, a fim de identificar a purificação dos isolados. Quando purificados, os isolados foram estocados em meio de cultura batata, adicionados ao meio de cultura óleo mineral estéril, e estocados para posteriores caracterizações.

2.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada após a purificação dos isolados. As colônias foram avaliadas após 7 dias de crescimento em meios sólidos específicos, e a distinção das colônias foi realizada a olho nu e com auxílio de uma lupa. Foram observadas características como: tamanho, forma, borda, superfície, elevação, transparência e cromogênese (DÖBEREINER e outros, 1995).

2.2 Caracterização fisiológica

2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio

Para avaliar a capacidade dos isolados bacterianos em fixar nitrogênio atmosférico (N₂), por método qualitativo, foi realizada a inoculação das bactérias em meios de cultura semissólidos e semisseletivos: JNFb, sem a adição de nitrogênio.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C, por 5 dias. A característica de fixar nitrogênio foi observada mediante a formação de uma película aerotóxica típica, próximo da superfície do meio.

2.2.2 Produção de Ácido Índol Acético (AIA)

Para avaliação e quantificação da produção do ácido indol acético, foi adotada a metodologia descrita por Gordon; Weber (1951), com modificações. Os isolados foram cultivados a partir de colônias isoladas em meio líquido, Caldo nutriente suplementado com 5mM de L-triptofano (100 µg.mL⁻¹), incubados sob agitação (120 rpm), a 28°C, na ausência de luz, por um período de 72 horas. Após o período de cultivo, os compostos indólicos foram estimados no sobrenadante das culturas, obtido por centrifugação e acrescidas do reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5M em 35% de ácido perclórico) e, novamente, incubadas a 28°C, por um período de 30 minutos, na ausência de luz (HARTMANN e outros, 1983). Logo após, foi realizada a quantificação de AIA pela medição da absorbância (540 nm), sendo a concentração estimada pela equação da reta gerada por uma curva padrão, previamente estabelecida. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado, e quantidades conhecidas de ácido indolacético de 0, 5, 15, 25, 50, 75 e 100 µg mL⁻¹, de acordo com a equação $\hat{y} = 0,0123x + 0,0563$ ($r^2 = 0,9951$).

2.3 Análises estatísticas

A análise do isolamento das bactérias foi discutida de forma descritiva, e foi realizado um dendograma de similaridade com base na distância euclidiana, com uso do programa Statistica, versão 10 (2011), visando avaliar o agrupamento dos isolados nas diferentes classes.

O agrupamento das classes do dendograma foi realizado com base nas características morfológicas das colônias bacterianas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento bacteriano em diferentes genótipos

Houve formação de película característica nos meios semissólidos NFb e JNFb nas folhas e raiz de eucalipto, em todos os isolamentos, demonstrando a presença de bactérias diazotróficas. Entretanto, no 2º isolamento para *E. urograndis*, nos meios JMV e LGI, em folha e raiz, respectivamente, não houve formação da película (Tabela 1).

É possível observar pela média geral, que a população de bactérias foi superior no isolamento realizado com a raiz das plantas; somente no meio JNFb que a população de bactérias na folha foi superior (Tabela 1).

Tabela 1 – População de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de eucalipto em diferentes genótipos.

Isolamento	NMP							
	NFb		JNFb		JMV		LGI	
	F	R	F	R	F	R	F	R
<i>E. urophylla</i>	4,5x10 ³	4,5x10 ⁵	2,5x10 ³	2,5x10 ⁵	1,5x10 ³	2 x10 ⁵	9,5x10 ²	4,5x10 ⁴
<i>E. urophylla</i>	1,1x10 ²	1,4x10 ⁵	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁴	1,1x10 ²	3x10 ⁴	4,0x10 ¹	1,4x10 ⁷
<i>E.urograndis</i>	9,0x10 ¹	9,5x10 ³	4,0x10 ¹	4,5x10 ³	0	4,5x10 ³	2,5x10 ³	0
<i>E. urophylla</i>	4,5x10 ³	9,5x10 ⁴	9,5x10 ³	9,5x10 ⁴	1,5x10 ³	2x10 ⁵	2,5x10 ³	9,5x10 ⁵
Média geral	2,3x10 ³	1,73x10 ⁵	3,5x10 ⁵	9,8 x10 ⁴	7,7 x10 ²	1,08x10 ⁵	1,49x10 ³	3,78x10 ⁶

*NMP: número mais provável / F: folha/ R: raiz

As raízes das plantas excretam de 10-44% do carbono fotossinteticamente fixado, e este serve como fonte de energia, moléculas sinalizadoras ou antimicrobianas para microrganismos do solo.

Outro fato que explica essa maior população nas raízes é o fenômeno quimiotático, que atrai bactérias em direção aos exsudatos radiculares, importante para a colonização das raízes e seleção orientada pelas plantas (HARTMANN e outros, 2009). Essas moléculas podem atrair BPCP's e inibir bactérias patogênicas, através de competição de nicho ou compostos antibacterianos (BAIS e outros, 2006).

É provável que a menor população observada nas folhas esteja associada à alta concentração de compostos orgânicos que, segundo Doran (1991), os óleos presentes nas folhas de eucalipto são formados por uma mistura complexa de componentes, envolvendo de 50 a 100 compostos orgânicos voláteis; já Figueiredo e outros (2013) constataram que as folhas de *E. urophylla* possui maior concentração de óleos α -felandreno (45%), que é utilizado, muitas vezes, como antimicrobiano, por conseguinte, essa alta

concentração de óleos pode ter resultado na menor população de isolados bacterianos nas folhas nos genótipos de eucalipto.

Houve o maior número de isolados no primeiro isolamento com mudas com idade de 100 dias de *E. urophylla* (clone AEC144), sendo 7 isolados de raiz e 6 das folhas, nos demais isolamentos, todos foram de raiz, totalizando 19 isolados de eucalipto (Tabela 2), sendo deste total, 9 isolados de JNFb (similares *Herbaspirillum* spp.), 9 isolados de JMV (similares *Burkholderia* spp.), 1 isolado de LGI (similar *A. amazonense*), e não foi possível isolar bactérias similares a outras espécies de *Azospirillum* spp. (NFb).

Tabela 2 – Isolados bacterianos associados às mudas e plantas de diferentes genótipos de eucalipto.

1° isolamento	
Espécie	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
Material	Mudas com 100 dias
ISOLADOS	UESBJNF4E UESBJNF1E UESBJNR2E UESBJNR3E UESBJNR4E UESBJNR6E UESBLGF2E UESBJMR2E UESBJMR5E UESBJMR6E UESBJMF1E UESBJMF3E UESBJMF2E
2° isolamento	
Espécie	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
Material	Plantas 190 dias
ISOLADOS	UESBJNR32E UESBJMR32E

2° isolamento	
Espécie	<i>E. urograndis</i> clone 1528
Material	Plantas 190 dias
ISOLADOS	UESBJMR21E
3° isolamento	
Espécie	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
Material	Plantas 130 dias
ISOLADOS	UESBJNR5E UESBJMR3E UESBJNR1E
Total de isolados	19

É possível observar que, mesmo com valores altos da população inicial de bactérias (Tabela 1), esse número não refletiu no número total de isolados. Acredita-se que microrganismos oportunistas e não diazotróficos foram favorecidos por compostos ricos em carbono, presentes nos meios, e pela síntese dos compostos nitrogenados, favorecendo, assim, o crescimento da película. Entretanto, nas sucessivas repicagens, as colônias isoladas não mantiveram seu crescimento.

Algumas espécies não fixadoras conseguem utilizar traços de N que, geralmente, existem nos outros compostos nitrogenados do meio de cultura, e bactérias não fixadoras também podem crescer como contaminantes à custa da amônia excretada no meio de cultura pelas bactérias fixadoras de N₂ (MOREIRA, 1994).

Em estudo com *E. urograndis*, Procopio (2004) relatou também uma baixa frequência de isolamento em diferentes clones, e sugere que isso seja devido à variação de compostos fenólicos e óleos essenciais produzidos pela planta, o que dificulta o isolamento.

Outro fato que pode ter ocorrido é a possibilidade do eucalipto se associar a bactérias de outros gêneros, que são isoladas em diferentes meios de cultivo, que não foram testados neste trabalho.

3.2 Caracterização fisiológica dos isolados

Quanto às caracterizações fisiológicas, a produção de compostos indólicos foi observada para todos os isolados. Os valores variaram entre 57,98 à 66,66 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AIA (auxina), enquanto a fixação biológica de nitrogênio foi observada somente para os isolados UESBJNR6E, UESBJMR32E, UESBJNR32E, UESBJMF3E2, UESBJMF1E, UESBJMF3E1, UESBJMF2E, UESBLGF2E, UESBJMR5E (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos de eucalipto, quanto à produção de compostos indólicos e à fixação biológica qualitativa de nitrogênio.

Isolados	Parâmetros fisiológicos	
	Ácido índol-acético ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Fixação biológica de N
UESBJNF1E	57,98	Não
UESBJNF4E	58,10	Não
UESBJNR2E	59,12	Não
UESBJNR4E	59,49	Não
UESBJNR6E	59,51	Sim
UESBJNR1E	63,47	Não
UESBJMR32E	64,00	Sim
UESBJNR32E	65,13	Sim
UESBJNR5E	65,30	Não
UESBJMR21E	65,77	Não
UESBJNR3E	66,04	Não
UESBJMF3E2	66,09	Sim
UESBJMF1E	66,10	Sim
UESBJMF3E1	66,23	Sim
UESBJMF2E	65,13	Sim
UESBLGF2E	66,45	Sim
UESBJMR6E	66,54	Não
UESBJMR5E	66,63	Sim
UESBJMR2E	66,66	Não

Solano e outros (2008) afirmaram que 80% das bactérias do solo e rizosfera são capazes de produzir auxinas. A produção *in vitro* desse hormônio por bactérias é diretamente proporcional à quantidade de triptofano, que tem sido avaliada em concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PARK e outros, 2005; TSAVKELOVA e outros, 2007; AHMAD e outros, 2008).

Diferentemente do trabalho atual, Paz (2009) obteve valores de 17,15 a 27,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, produzidas por bactérias endofíticas isoladas de eucalipto, e o autor sugere que, para o cultivo em viveiro, o valor de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA é o ideal para o crescimento adequado das plantas e sistema radicular. Já Castellanos e outros (2010), em isolamento com *Eucalyptus* sp., obtiveram o valor máximo de 49,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA.

O presente trabalho obteve valores de AIA na faixa de 57,98 a 66,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$, superior aos demais trabalhos relatados anteriormente, constatando que os isolados obtidos são promotores de crescimento vegetal (quanto à produção de auxina), visto que o AIA está relacionado ao alongamento de células, pois promove o aumento da plasticidade da membrana e é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (TAIZ; ZEIGER, 2017). Acredita-se que seu efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e nutrientes do solo.

3.3 Dendograma de similaridade dos isolados bacterianos

O dendograma de similaridade conseguiu agrupar os isolados conforme as características morfológicas, e o mesmo foi analisado a partir de duas distâncias, considerando a distância euclidiana, que pressupõe que quanto maior o valor observado menos parecidos (mais dissimilares) serão os objetos (Figura 1).

Na menor distância (até 1,7) os isolados UESBJNF4E, UESBJNR2E, UESBJNF1E, UESBJNR4E, UESBJNR3E, UESBJMF1E, UESBJMR32E, UESBJNR6E, UESBJNR32E, UESBJMR5E, UESBJMLGF2E e

UESBJMFR2E formaram um grupo que mais se assemelharam a *Azospirillum* spp. Podendo observar que, dentro deste grupo, a distância 1 foi a menor, e conseguiu agrupar os isolados UESBJNF4E, UESBJNR2E, UESBJNF1E.

O 2º grupo, com coeficiente acima de 1,7, uniu os isolados UESBJNRE, UESBJMR5E, UESBJMR6E, UESBJMF3E, UESBJMF3E2 que mais se assemelharam aos padrões de *Herbaspirillum* spp. (meio JNFb), *Azospirillum amazonense* (meio LGI), *Burkholderia* spp. (meio JMV), sendo que neste grupo os isolados UESBJMF3E, UESBJMF3E2 foram os que mais se distanciaram, com valor de 3,2.

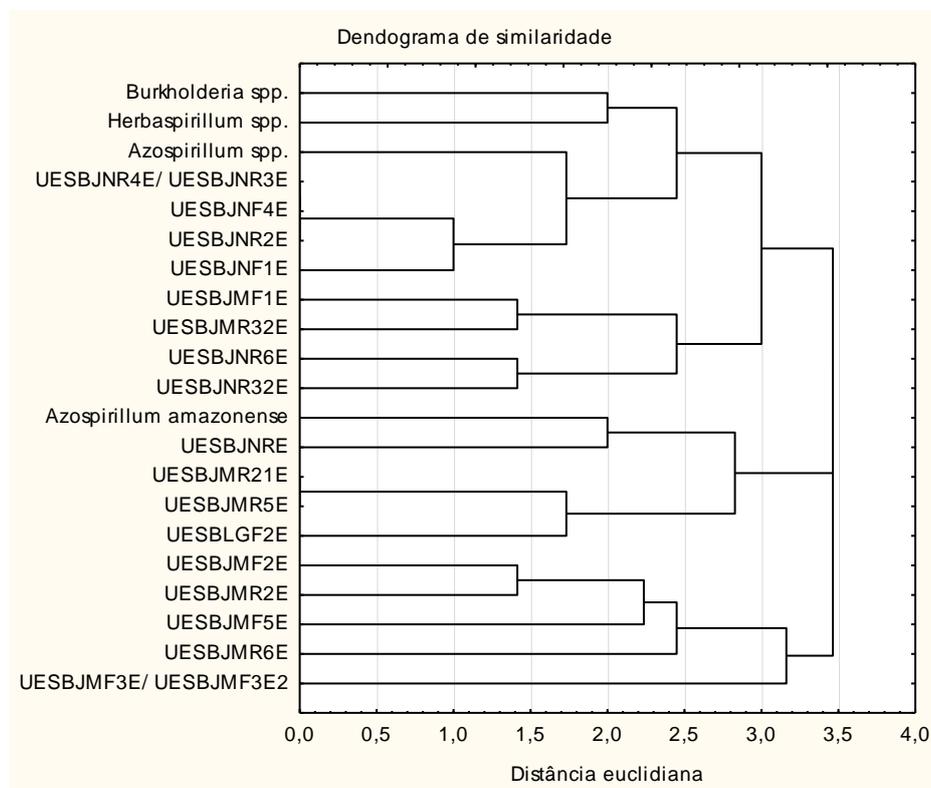


Figura 1 – Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de Eucalipto.

Nota-se que o padrão *Azospirillum* spp. (meio NFB) foi o que se assemelhou ao maior número de isolados de eucalipto. Observa-se que os isolados UESBJNR6E, UESBJMR32E, UESBJNR32E, UESBJMF1E, UESBLGF2E e UESBJMR5E foram os únicos que apresentaram a fixação

qualitativa de nitrogênio (Tabela 3), corroborando os resultados deste trabalho, já que se assemelharam ao *Azospirillum* spp., e visto que este gênero é caracterizado por sua fixação biológica de nitrogênio.

Foi observado, ao logo do experimento de isolamento, que os isolados do eucalipto apresentaram características de crescimento diferenciadas dos padrões relatados na literatura, tanto em meio semissólido ou sólido. O tempo de crescimento foi superior ao relatado na literatura, com cerca de 8 a 14 dias, dependendo do isolado, e acidificação do meio também foi uma resposta diferente porque era observado o crescimento e formação de película aerotáxica, entretanto, a acidificação quase não ocorria.

Todas essas características que se diferenciam dos padrões levam a crer que o eucalipto se associa com gêneros diferentes daqueles que se associam comumente às culturas agrônômicas, possivelmente, devido ao tipo de exsudatos liberados pela cultura.

Castellanos e outros (2010), na Colômbia, identificaram em eucalipto que os gêneros de *Beijerinckia* spp., *Azotobacter* spp. e *Dexia* spp. foram os que se assemelharam à maior quantidade de isolados; e os padrões dos gêneros de *Burkholderia* sp. *Gluconacetobacter* sp. e *Herbaspirillum* sp. foram os menos representados.

Trabalhando com o isolamento de bactérias endofíticas em eucalipto, Paz (2009) também observou uma falta de relação entre os grupos morfológicos e a identificação dos isolados e, para ele, isso denota a fragilidade do uso de caracteres morfológicos para a caracterização de bactérias, devido à variabilidade genética das mesmas, podendo ocorrer de indivíduos de uma mesma espécie não se agruparem.

Segundo Combes-Meynet e outros (2011), a coevolução das plantas, devido à presença de microrganismos, pode ter levado a modificações na composição dos exsudatos radiculares, permitindo uma seleção específica da microbiota por um dado genótipo da planta.

Levando em consideração que o material genético utilizado para a seleção das bactérias são clones melhorados geneticamente, e que o eucalipto

é comumente utilizado na fabricação de produtos bactericidas, devido sua produção de óleos essenciais, pode ter ocorrido essa coevolução e seleção de grupos específicos de bactérias, que se diferenciam das demais culturas, e que são isolados em meios de cultivo diferentes dos testados neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

Dezenove isolados bacterianos, sendo 12 isolados de raiz e 7 de folha, foram isolados de diferentes genótipos de Eucalipto;

Todos os 19 isolados produzem auxina e 9 isolados (UESBJNR6E, UESBJMR32E, UESBJNR32E, UESBJMF3E2, UESBJMF1E, UESBJMF3E1, UESBJMF2E, UESBLGF2E, UESBJMR5E) são caracterizados com fixadores de nitrogênio;

O gênero *Azospirillum* é o mais representado morfológicamente pelos isolados (UESBJNF4E, UESBJNR2E, UESBJNF1E, UESBJNR4E, UESBJNR3E, UESBJMF1E, UESBJMR32E, UESBJNR6E, UESBJNR32E, UESBJMR5E, UESBJMLGF2E e UESBJMFR2E), que foram agrupados pelo dendograma de similaridade.

5 REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, n.2, p.173-181, 2008.

AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F. G.; VARGAS, L.; PASSAGLIA, L. M. P. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Soil** v. 356, p. 245-264. 2012.

ARAÚJO, A. R. A.; FONSECA, F. S. T.; HENDGES, T. L. Análise de viabilidade econômica da produção de eucalipto na cidade de Balsas- MA para a geração de energia. **Revista Científica Faculdade de Balsas**, n. 1, p. 1- 21, 2010.

BAIS, H, P.; WEIR, T. L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M.; The role of root exudates in rizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**. v. 57, p. 233-66. 2006.

BAL, H.B.; NAYAK, L. DAS S.; ADHYA, T. K. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant Soil** v. 366, p. 93-105. 2013.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579. 2005.

BAO, Z.; SASAKI, K.; OKUBO, T.; IKEDA, S.; ANDA, M.; HANZAWA, E.; KAORI, K.; TADASHI, S.; HISAYUKI, M.; MINAMISAWA, K. Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice-associated bacterial communities in a paddy field. **Microbes and Environments**, v. 28, p. 487-490. 2013.

BAUDOIN, E.; LERNER, A.; MIRZA, M. S.; ZEMRANY, H.E.; PRIGENT-COMBARET, C.; JURKEVICH, E.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; NAZARET, S.; OKON, Y.; *et al.* Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology** v. 161, p. 219-226. 2010.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45(1), p. 28–35. 2009.

CASTELLANOS, D. M. O.; ZABALA, L. B. B.; BOTÍA, D. M. R.; GARRIDO, M. F. R.; BALDANI, V. L. D.; BUITRAGO, R. R. B.; Caracterización De Bacterias Diazotróficas Asimbióticas Asociadas Al Eucalipto (*Eucalyptus* Sp.) En Codazzi, Cesar (Colombia). **Acta biológica Colombiana**, v. 15, p. 107 – 120. 2010.

COMBES-MEYNET, E.; POTHIER, J. F.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, C. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 24, p. 271–284. 2011.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60 p.

DORAN, J. C. Commercial sources, uses, formation and biology. IN: Boland, D. J.; Brophy, J. J.; House, A. P. N. **Eucalyptus leaf oil: use, chemistry, distillation and marketing**. eds.; Inkata: Melbourne, p. 11. 1991.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v.72, p. 103-108. 2013.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G.; TRINDADE, H. Óleos essenciais de espécies de Eucalyptus. **Agrotec: Revista Técnico-científica Agrícola**, v. 8, p. 96- 100. 2013.

GOMIDE, J. L.; FANTUZZI NETO, H.; REGAZZI, A. J. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. **Revista Árvore**, v. 34, p. 339- 344, 2010.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

GRANADA, C.; COSTA, P. B.; LISBOA, B. B.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L. M. P. Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. **Plant Soil**. v. 373, p. 339-358. 2013.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.29, p.916-923, 1983.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; TUINEN, D. VAN.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, v.321, p. 235–257. 2009.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v.331, p. 413-425. 2010.

IKEDA, A. G.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; MARIA STEFFENS, B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI- TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization

of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology** v. 65, p. 154-160. 2013.

MOREIRA, F. M. S. Parte III. Diazotróficos Associativos: Métodos de isolamento e identificação de microrganismos associativos fixadores de N₂. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola**, EMBRAPA, p.337-353, 1994.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiology Research**, v.160, p.127–133, 2005.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PROCÓPIO, R. E. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

REMADE, **Revista da Madeira**. Ano 11 - n. 59, setembro de 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br>, Acesso em: 12 de Agosto. 2016.

SHARMA, S, K.; RAMESH, A.; JOHRI, B. N. Isolation and characterization of plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Virology & Microbiology**, v. 2013, p. 1-19. 2013.

SOLANO, B. R.; BARRIUSO, J.; GUTIERREZ-MANERO, F. J.; Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. p.41-54. 2008.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, J.; VARGAS, L. K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L. M. P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant Soil** v. 366, p.585-603. 2013.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant Soil** v. 312, p. 15-23. 2008.

SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growthpromoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters** v. 296, p. 131-136. 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; KLIMOVA, S. Y.; SHESTAKOV, A. I.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, v.188, p.655–664, 2007.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, J. S.; SAXENA, A. K.; SINGH, D. P. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. **Plant Biology**, v.14, p. 605-611. 2012.

VIVAN, G. A.; BARBOZA, F. da S.; LUZ, M. L. S. da.; LUZ, C. A. S. da.; RAMIREZ, O. P.; GOMES, M. C.; SOARES, F.C. Estudo técnico e econômico de um sistema móvel de extração de óleo essencial de eucalipto. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 23-31, 2011.

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM EUCALIPTO EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM EUCALIPTO EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar, em casa de vegetação, bactérias que promovam o crescimento e desenvolvimento de plantas de eucalipto. Para isso, foram realizados dois experimentos de seleção com o clone AEC 144 de *Eucalyptus urophylla*, o primeiro de junho a agosto de 2016, com duração de 45 dias, tendo como tratamento 14 isolados bacterianos e 1 controle sem inoculação, com 4 repetições, dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi avaliada a altura das plantas, diâmetro, índice de robustez das mudas e a contagem do número de folhas das plantas. No segundo, realizado de março a maio de 2017, com duração de 30 dias, os tratamentos foram 17 isolados bacterianos e 1 controle sem inoculação, 4 repetições, dispostos em DIC. Foi avaliada a altura, diâmetro, índice de robustez, contagem do número de folhas das plantas, o Índice Spad e peso de massa seca de parte aérea. Os isolados bacterianos UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR5E, UESBJNR3E, UESBJMR6E, UESBJMR21E, UESBJMR5E, nativos do eucalipto; e as estirpes LGAM82, ZAE94, J11 e N15 promovem o crescimento e desenvolvimento em eucalipto, nos experimentos de seleção realizados.

PALAVRAS-CHAVE: *Eucalyptus urophylla*; desenvolvimento de plantas; rizobactérias.

ABSTRACT

The objective of this work was to select in greenhouse, bacteria that promote the growth and development of eucalyptus plants. Two selection experiments were carried out with the AEC 144 clone of *Eucalyptus urophylla*, the first from June to August 2016, with a duration of 45 days, with 14 bacterial isolates and 1 control without inoculation, with 4 replicates, in a completely delineated (DIC). The height of the plants, diameter, robustness index of the seedlings and the number of leaves of the plants were evaluated. In the second, carried out from March to May 2017, with a duration of 30 days, the treatments were 17 bacterial isolates and 1 control without inoculation, 4 replicates, disposed in DIC. The height, diameter, robustness index, count of plant leaves, Spad Index and dry mass weight of shoot were evaluated. The bacterial isolates UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR5E, UESBJNR3E, UESBJMR6E, UESBJMR21E, UESBJMR5E native to the eucalyptus and the strains LGAM82, ZAE94, J11 and N15 promote growth and development in eucalyptus in the selection experiments performed.

KEYWORDS: *Eucalyptus urophylla*; plant development; rhizobacteria.

1 INTRODUÇÃO

A interação entre planta e microrganismo é uma etapa essencial para a maioria dos fatores relacionados ao crescimento das plantas. Essa associação depende de diversos elementos, como genótipo, idade da planta, tipos de exsudatos liberados, fatores edáficos, clima, interação da microbiota do solo (CAI e outros, 2012; CARVALHAIS e outros, 2013), e tudo isso facilita ou dificulta essa associação.

As bactérias promotoras de crescimento, ao se associarem às plantas, podem agir como biofertilizantes (aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta), fitoestimulantes (devido à promoção de crescimento de plantas, geralmente através de hormônios), rizoremediadores (devido à degradação de poluentes orgânicos) e biopesticidas, pelo controle de doenças (SOMERS e outros, 2004; ANTOUN; PRE'VOST, 2005).

A fim de elucidar essas ações e comprovar sua eficiência em campo, os ensaios com isolados bacterianos são necessários, pois conseguem mostrar padrões e respostas que podem ser diferentes dos apresentados em laboratório.

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento pode ser realizada de diversas formas, sendo aplicadas como inoculante líquido (SINGLETON e outros, 2002), turfoso, granulado (XAVIER e outros, 2004), com uso de material orgânico (ALBAREDA e outros, 2008), material inorgânico (SARAVANAKUMAR e outros, 2009), aplicação direta no sistema radicular (CHOUDHURY; KENNEDY, 2004), sementes (CLAYTON e outros, 2004), hastes ou miniestacas, buscando a promoção de crescimento das plantas, que resulta em incrementos na parte aérea, massa seca, crescimento radicular, dentre outros.

Na cultura do eucalipto, poucos estudos foram realizados com a seleção de bactérias, porque a maioria dos trabalhos cessam as pesquisas em laboratório, ou já usam produtos selecionados e disponíveis no mercado.

Esses estudos com bactérias promotoras de crescimento têm selecionado espécies em diversas culturas, como soja, milho, sorgo, arroz, feijão, dentre

outros, e, devido à importância econômica do eucalipto (ABRAF, 2010), é essencial o estudo de tecnologias que auxiliem no crescimento das plantas, que intensifique a produção e minimize os gastos.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi selecionar, em casa de vegetação, bactérias que promovam o crescimento e desenvolvimento de plantas de eucalipto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos de seleção de bactérias em casa de vegetação, ambos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), e ambos com o clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*.

2.1 Primeiro experimento de seleção de isolados bacterianos

Este experimento foi desenvolvido de junho a agosto de 2016, sendo 45 dias de avaliação, utilizando mudas com idade de 100 dias, plantadas em vasos de 14 litros.

Os vasos foram preenchidos com amostra de solo representativo do campo agropecuário da UESB, com as características químicas: pH em H₂O 5,4; P 4 mg dm⁻³; Ca 3,5 cmol_c dm⁻³; Mg 0,9 cmol_c dm⁻³; K 0,25 cmol_c dm⁻³; Al 0,1 cmol_c dm⁻³, V 66 %, o qual foi previamente adubado, buscando a correção da fertilidade e atendimento às demandas nutricionais tradicionalmente estabelecidas para a cultura do eucalipto (RIBEIRO e outros, 1999).

Os tratamentos foram constituídos por 14 isolados bacterianos e 1 controle sem inoculação, totalizando 15 tratamentos com 4 repetições, perfazendo 60 parcelas, dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 3 ml da

solução bacteriana colocados diretamente em contato com a raiz antes do plantio, todos os isolados foram padronizados com uma população de 10^9 u.f.c.

Foram utilizados os isolados: UESBJNR2E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJMR2E, UESBLGF2E, UESBJNR1E, UESBJNR3E, UESBJNR5E, UESBJMR21E, UESBJNR4E, UESBJMFE2, UESBJMF3E, UESBJNF4E, UESBJM6R, os quais foram isolados anteriormente de plantas de *Eucalyptus* sp.

Ao fim dos 45 dias, foi avaliada a altura das plantas com auxílio de régua graduada, o diâmetro com uso de paquímetro digital, o índice de robustez das mudas que é a razão da altura dividida pelo diâmetro, e foi realizada a contagem do número de folhas das plantas.

2.2 Segundo experimento de seleção de isolados bacterianos

Este experimento foi desenvolvido de março a maio de 2017, sendo 30 dias de avaliação, utilizando mudas com idade de 100 dias, plantadas em vasos de 18 litros.

Os vasos foram preenchidos com amostra de solo representativo do campo agropecuário da UESB, com as características químicas: pH em H₂O 5,6; P 3 mg dm⁻³; Ca 2,5 cmolc dm⁻³; Mg 0,7 cmolc dm⁻³; K 0,22 cmolc dm⁻³; Al 0,1 cmolc dm⁻³, V 63 %, o qual foi previamente adubado, buscando a correção da fertilidade e atendimento às demandas nutricionais tradicionalmente estabelecidas para a cultura do eucalipto (RIBEIRO e outros, 1999).

Os tratamentos foram constituídos por 17 isolados bacterianos e 1 controle sem inoculação, totalizando 18 tratamentos com 4 repetições, perfazendo 72 parcelas, dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 3 ml da

solução bacteriana colocados diretamente em contato com a raiz antes do plantio. Todos os isolados foram padronizados com uma população de 10^9 UFC.

Foram utilizados os isolados: UESBJNR5E, UESBLGF2E, UESBJMF3E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJMR21E, UESBJNR3E, UESBJMR32E, UESBJMF2E, UESBJMR2E, UESBJM6R, UESBJMR5E (todos isolados anteriormente de *Eucalyptus* sp.), ZAE94 (*Herbaspirillum seropedicae*), LGAM82, JMBR366 (os três cedidos pela Embrapa Agrobiologia- Seropédica), J11 e N15 (isolados anteriormente de milho por SANTOS, 2015).

Ao fim dos 30 dias, foi avaliada a altura (cm) das plantas com auxílio de régua graduada, o diâmetro (mm) com uso de paquímetro digital, o índice de robustez das mudas que é a razão da altura dividida pelo diâmetro, foi realizada a contagem do número de folhas das plantas, o Índice Spad utilizando-se um clorofilômetro marca Opti-sciences, modelo CCM/200. A avaliação foi realizada em três folhas completamente expandidas e fisiologicamente maduras, localizadas na porção mediana da copa. Para cada planta, considerou-se o índice SPAD como resultante da média aritmética dessas três folhas; Peso de massa seca de parte aérea, cujo material foi acondicionado em embalagens de papel e submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, durante 72 horas, e o peso foi verificado utilizando balança de precisão de 0,001 mg;

2.3 Análise estatística

Em ambos os experimentos, os resultados obtidos foram submetidos à análise de Normalidade (Teste de Lilliefors) e Homogeneidade (Teste de Batlett) dos dados, conforme recomendação de Banzatto & Kronka (2006). A análise de variância (ANAVA) foi realizada pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), e quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Primeiro experimento de seleção

A altura foi influenciada significativamente, quando foram inoculados os isolados UESBJNR2E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBLGF2E, UESBJNR5E, UESBJNR4E, UESBJMF3E, UESBJNF4E e na presença do tratamento controle sem inoculação (Tabela 1).

Tabela 1 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), índice de robustez (HD), número de folhas (NUF) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos

TRATAMENTOS	ALT(cm)	DIA(mm)	HD	NUF
CONTROLE	43,00A	4,69B	9,17A	50,00D
UESBJNR2E	44,25A	5,68A	7,81B	56,00D
UESBJNR32E	44,50A	5,88A	7,54B	58,00D
UESBJNR6E	43,00A	5,67A	7,63B	61,00D
UESBJMR2E	43,75A	4,65B	9,53A	61,00D
UESBLGF2E	42,50A	4,91B	8,66A	68,00C
UESBJNR1E	38,50B	4,99B	7,72B	68,00C
UESBJNR3E	41,25B	5,75A	7,18B	68,00C
UESBJNR5E	44,50A	5,56A	8,03B	69,00C
UESBJMR21E	40,50B	5,50A	7,44B	69,00C
UESBJNR4E	43,00A	5,32A	8,08B	70,00C
UESBJMF2E	38,75B	4,71B	8,24B	70,00C
UESBJMF3E	43,25A	5,70A	7,64B	79,00B
UESBJNF4E	43,50A	5,60A	7,76B	92,00A
UESBJMR6E	41,00B	5,25A	7,80B	94,00A
CV (%)	4,94	8,62	7,46	9,63

Valores apresentados são provenientes da média de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Em relação ao diâmetro das plantas (Tabela 1), este foi superior na presença dos isolados UESBJNR2E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR3E, UESBJNR5E, UESBJMR21E, UESBJNR4E, UESBJMF3E,

UESBJNF4E, UESBJMR6E, sendo que o UESBJNR32E demonstrou superioridade ao controle em 25,37%.

Os isolados bacterianos citados anteriormente promoveram valores de diâmetro superiores a 5,00 mm, e, conforme South e outros, (1993), mudas com diâmetro de 5,00 mm apresentaram uma taxa de sobrevivência de 85% no campo, após 2 meses.

Os melhores resultados de índice de robustez foram obtidos na presença dos isolados UESBJNR2E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR1E, UESBJNR5E, UESBJMR21E, UESBJNR4E, UESBJMF2E, UESBJMF3E, UESMJNF4E, UESBJMR6E e UESBJNR3E, sendo este último superior 21,70% ao controle, apresentando o menor índice de robustez e, por consequência, uma melhor qualidade de muda no campo (Tabela 1).

O índice de robustez está associado à estabilidade das plantas no campo, indicando o quanto a planta está delgada e, conseqüentemente, a estabilidade da planta. Sabe-se que quanto menor esse valor, melhor será essa relação (GOMES; PAIVA, 2004).

O número de folhas das plantas foi o que mais diferenciou os isolados, sendo que UESBJNF4E e UESBJMR6E apresentaram maior quantidade de folhas, sendo o último superior a 88% ao controle (Tabela 1).

O UESBJNR32E foi o que se destacou nas avaliações de altura e diâmetro, sendo caracterizado anteriormente como produtor de auxina ($65,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ AIA) e como fixador de nitrogênio. Essas características aliadas resultaram em respostas significativas, visto que a produção de auxina favorece a expansão dos tecidos, resultando, posteriormente, em ganhos em altura e diâmetro. A possibilidade de fixar nitrogênio e o disponibilizar para a planta faz com que a planta cresça, devido à produção de novos tecidos ocasionados pela maior presença de moléculas de DNA e RNA.

Os isolados UESBJNR3E e UESBJMR6E, que se destacaram nas avaliações de robustez e número de folhas, respectivamente, são isolados caracterizados como produtores de AIA ($66,04$ e $66,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A produção de auxina geralmente afeta a divisão celular, extensão e diferenciação,

aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz e controla processos de crescimento vegetativo (GLICK, 2012), respostas que corroboram os resultados obtidos neste trabalho.

Pode-se constatar que essas bactérias nativas têm a capacidade de estimular o crescimento vegetativo nas plantas de eucalipto, e outro fato importante é que o UESBJNR32E foi isolado de mudas de *E. urophylla* clone AEC144, mesmo clone utilizado neste experimento, deixando claro, mais uma vez, a importância da simbiose das bactérias com os genótipos específicos.

3.2 Segundo experimento de seleção

A altura das plantas foi superior, quando inoculadas com os isolados UESBJMR5E, LGAM82, JMBR366 e N15, sendo que o nativo de eucalipto UESBJMR5E proporcionou crescimento de 31,09%, superior ao controle (Tabela 2).

Em relação ao diâmetro, os isolados UESBJNR5E, UESBLGF2E, UESBJMR21E, UESBJMF2E, UESBJNR3E, UESBJMR2E, ZAE94, J11, LGAM82 e JMBR366 foram superiores ao demais.

Segundo Wendling; Dutra (2010) e Lopes e outros, (2005), mudas de qualidade em eucalipto apresentam padrão de 15-35 cm de altura e $\geq 2,0$ mm de diâmetro. Todos os isolados nativos proporcionaram valores superiores ao descrito, constatando a importância do uso dessas bactérias em eucalipto.

Tabela 2 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), índice Spad (SPAD), número de folhas (NUF), número de brotações (BROT), índice de robustez (HD), massa seca de parte aérea (MPA) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos.

TRATAMENTOS	ALT (cm)	DIA (mm)	SPAD	BROT	NUF	HD	MPA (g)
CONTROLE	29,75D	3,77C	51,22A	3,00B	10,75C	7,88C	7,80C
UESBJNR5E	28,50D	4,82A	43,15D	4,50B	11,00C	5,91D	9,79A
UESBLGF2E	28,50D	4,47A	51,02A	3,00B	9,25D	6,37D	8,06C
UESBJMF3E	30,00D	3,97C	45,95C	4,25B	11,25C	7,55C	9,08B
UESBJNR32E	30,25D	3,87C	49,40A	3,50B	11,75C	7,83C	9,76A
UESBJNR6E	31,62C	4,23B	48,65B	4,37B	13,25C	7,49C	10,51A
UESBJMR21E	32,75C	4,37A	47,87B	5,75A	11,00C	7,54C	8,47C
UESBJNR3E	34,50B	4,66A	47,25B	6,25A	24,00A	7,41C	10,85A
UESBJMR32E	34,75B	4,64A	50,40A	6,25A	17,75B	7,48C	10,25A
UESBJMF2E	35,00B	4,34A	50,77A	4,75B	8,50D	8,05C	9,39B
UESBJMR2E	35,00B	4,58A	48,07B	6,25A	11,75C	7,69C	10,71A
UESBJMR6E	30,25D	4,18B	49,52A	3,50B	8,75D	7,23C	9,27B
UESBJMR5E	39,00A	4,08B	48,07B	6,25A	15,00B	9,58A	9,77A
ZAE94	31,75C	4,32A	50,75A	6,25A	17,25B	7,34C	10,76A
J11	35,50B	4,65A	49,47A	4,25B	11,00C	7,63C	10,77A
LGAM82	37,00A	4,52A	52,35A	5,00A	13,25C	8,18B	10,52A
JMBR366	37,25A	4,45A	50,70A	3,75B	8,25D	8,42B	9,42B
N15	37,75A	4,15B	48,67B	5,50A	11,25C	9,08A	10,10A
CV (%)	4,04	5,38	3,6	22,5	15,97	7,08	8,18

Valores apresentados são provenientes da média de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

O índice SPAD, os isolados UESBLJF2E, UESBJNR3E, UESBJMR32E, UESBJMF2E, UESBJMR6E, ZAE94, J11, LGAM82, JMBR366 e o controle apresentaram os maiores índices (Tabela 2).

O número de brotações é importante porque expressa a expansão da parte aérea e de novos tecidos. Os isolados que promoveram melhor resposta foram: UESBJMR21E, UESBJNR3E, UESBJMR32E, UESBJMR2E, UESBJMR5E,

ZAE94, LGAM82 e N15, proporcionando incrementos de até 108% superiores ao controle (Tabela 2).

O número de folhas com o uso do isolado UESBJNR3E (Tabela 2) proporcionou um incremento de 123% superior ao controle, resposta muito importante, devido ao aumento expressivo na área fotossintética da planta, o que resulta em maior disposição de carboidratos e crescimento da planta, podendo ser observado nos parâmetros de diâmetro, índice SPAD e número de brotações com a ação dessa mesma bactéria.

O índice de robustez obteve resultado superior, quando a inoculação das plantas foi com os isolados UESBLGF2E e UESBJNR5E, sendo que o último ofereceu resultado 25% superior ao controle (Tabela 2). Lembrando que, para esse parâmetro, os menores valores são os que exprimem uma resposta satisfatória.

Por fim, a massa seca de parte área das plantas foi significativa e superior, quando houve a associação com os isolados UESBJNR5E, UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR3E, UESBJMR32E, UESBJMR2E, UESBJMR5E, ZAE94, J11, LGAM82 e N15. Além disso, o isolado nativo de eucalipto UESBJNR3E proporcionou um incremento de 39,10% superior ao controle (Tabela 2).

Em ambos os experimentos de seleção, é importante salientar a sincronia do eucalipto com as bactérias que foram caracterizadas como semelhantes ao gênero *Azospirillum*. Esse gênero, além da fixação biológica de N (FUKAMI e outros, 2016) e produção de hormônios (CAVALLET e outros, 2000), promove um maior desenvolvimento radicular (KAZI e outros, 2016), aumento nos teores de clorofila e condutância estomática (HUNGRIA, 2011) e alterações na atividade fotossintética das plantas (GORDILLO-DELGADO e outros, 2016).

Outro fato é que ficou explícita a importância da associação com um genótipo específico, cujos isolados que mais se destacaram na promoção do crescimento, além das funções de fixação de nitrogênio e produção de auxina,

foram selecionados no clone AEC 144 de *E. urophylla*, mesmo clone utilizado neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos nativos de eucalipto (UESBJNR32E, UESBJNR6E, UESBJNR5E, UESBJNR3E, UESBJMR6E, UESBJMR21E), selecionados no 1º experimento, promovem o crescimento em plantas de eucalipto;

Os isolados bacterianos nativos de eucalipto (UESBJMR5E, UESBJNR3E, UESBJNR5E, UESBJMR21E, UESBJMR32E e as estirpes LGAM82, ZAE94, J11 e N15) promovem o crescimento em eucalipto, no estudo da 2º seleção.

5 REFERÊNCIAS

ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculant: solid and liquid formulations. **Soil Biol Biochem** v. 40, p. 2771–2779. 2008.

ANTOUN, H.; PRE´VOST, D., 2005. **Ecology of plant growth promoting rhizobacteria**. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer, Dordrecht, p. 1–38.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009**. Brasília: ABRAF, 2010. 140 p.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2008. 237 p.

CAI, Z.; KASTELL, A.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Exudation: Na expanding technique for continuous production and release PGPB in agricultural soils of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant cell reports** v.31, p. 461-477. 2012.

CAVALLET, L.; PESSOA, A.; HELMICH, J.; HELMICH, P.; Ost, C. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 4, p. 129-132, 2000.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; FAN, B.; FEDOSEYENKO, D.; KIERUL, K.; BECKER, A.; VON WIREN, N.; BORRISS, R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **PLoS One**. 2013.

CHOUDHURY, A. T.M.A.; KENNEDY, I.R.; Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biol Fertil Soils* 39:219–227. 2004.

CLAYTON, G.W.; RICE, W.A.; LUPWAYI, N. Z.; JOHNSTON, A.M.; LAFOND, G. P.; GRANT, C.A.; WALLEY, F. Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: crop yield and seed quality. **Can J Plant Sci** 84:89–96. 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express** v. 6, p. 1-13, 2016.

GLICK, B.R., 2012. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica.

GOMES, J, M; PAIVA, H, N. **Viveiros florestais: propagação sexuada 3**. Ed. Viçosa, MG: UFV, 2004, 116p.

GORDILLO-DELGADO, F.; MARÍN, E.; CALDERÓN, A. Effect of *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia unamae* Bacteria on Maize Photosynthetic Activity Evaluated Using the Photoacoustic Technique. **International Journal of Thermophysics** v. 37, p. 1-11, 2016.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Embrapa Soja, Documento 325. Londrina-PR. 2011.

KAZI, N.; DEAKER, R.; WILSON, N.; MUHAMMAD, K.; TRETOWAN, R. The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. **Field Crops Research** v. 196, p. 368-378, 2016.

LOPES, J. L. W.; GUERRINI, I. A.; SAAD, J. C. C.; SILVA, M. R.. Efeitos da irrigação na sobrevivência, transpiração e no teor relativo de água na folha em mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes substratos. **Scientia Forestalis**, v.68, p.97-106, 2005.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa, MG, CFSEMG/UFV, 1999. 359 p.

SARAVANAKUMAR D, LAVANYA N, MUTHUMEENA K, RAGUCHANDER T, SAMIYAPPAN R. Fluorescent pseudomonad mixtures

mediate disease resistance in rice plants against sheath rot (*Sarocladium oryzae*) disease. **Biocontrol** 54:273–286. 2009.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. **Development and evaluation of liquid inoculants**. in: Herridge D (ed) Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. ACIAR Proceedings, p 52–66. 2002

SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J., SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. **Crit. Revista Microbiologia** 30, 205–240. 2004.

SOUTH, D.B.; ZWOLINSKI, J.B.; DONALD, D.G.M. Interactions among seedling diameter grade, weed control and soil cultivation for *Pinus radiata* in South Africa. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 23, p. 2078-1082, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

XAVIER, I. J.; HOLLOWAY, G.; LEGGETT, M. Development of rhizobial inoculant formulations. **Crop Management**, v. 3. 2003.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto por sementes. In: WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas; 2010. p. 13-47.

CAPÍTULO III

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL
ASSOCIADAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM *Eucalyptus*
urophylla S. T. BLAKE**

**Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal Associadas à Adubação
Nitrogenada em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho estudar bactérias promotoras de crescimento vegetal em eucalipto, associado a doses de sulfato de amônio, para se conhecer os benefícios ao crescimento inicial das plantas, determinando qual nível de nitrogênio e isolado bacteriano é mais eficaz. Foram utilizados 5 isolados bacterianos e um controle sem inoculação, e 4 níveis de sulfato de amônio 0, 20, 40 e 60 mg dm⁻³ N, em esquema fatorial e delineamento em blocos casualizados (DBC), montados em vaso de 20L, com o clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*. Foram avaliados: altura, diâmetro, massa seca, área foliar, índice Spad, Ntotal e fotossíntese. Os parâmetros de altura, diâmetro, área foliar, massa seca de parte aérea obtiveram maiores resultados com o isolado UESBJMR32E, nas doses de 26,20; 27,42; 29,50; 26,84 mg dm⁻³ N, respectivamente. O N total obteve a maior média com o isolado UESBJNR32E, na dose de 39,75 mg dm⁻³ N.

PALAVRAS-CHAVE: Eucalipto; rizobactérias; sulfato de amônio.

BACTERIA PROMOTING PLANT GROWTH AND NITROGEN
FERTILIZATION IN *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake

ABSTRACT

The objective of this study was to study plant growth promoting bacteria in eucalyptus, associated with doses of ammonium sulfate, to know the benefits to the initial growth of plants, determining which level of nitrogen and bacterial isolate is most effective. Five bacterial isolates and one control without inoculation were used, and four levels of ammonium sulfate 0, 20, 40 and 60 mg dm⁻³ N were used in a factorial scheme and a randomized complete block design (DBC), assembled in a 20L vessel, or the AEC144 clone of *Eucalyptus urophylla*. Height, diameter, dry mass, leaf area, Spad index, Ntotal and photosynthesis were evaluated. The parameters of height, diameter, leaf area, shoot dry mass obtained higher results with isolate UESBJMR32E, in the doses of 26,20; 27.42; 29.50; 26.84 mg dm⁻³ N, respectively. The Ntotal obtained the highest mean with isolate UESBJNR32E, at a dose of 39.75 mg dm⁻³ N.

Keywords: eucalypt; rhizobacteria; ammonium sulfate.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável e ecologicamente viável das culturas tem se tornado cada vez mais importante e necessário, visando, principalmente, a redução do uso de produtos químicos, que são utilizados para favorecer o desenvolvimento, controle de doenças e pragas, e ajudar estabelecer um padrão de qualidade para as culturas, mas que acarreta em grandes problemas ao meio ambiente.

A área plantada de eucalipto no Brasil é de 5,7 milhões de hectares, com 612 mil hectares, pertencendo ao estado da Bahia (IBÁ, 2017). Devido ao seu amplo uso como matéria-prima (GOMIDE e outros, 2010), diversas técnicas de produção como reguladores vegetais, microrganismos benéficos, diferentes tratamentos culturais são testados para melhorar o crescimento inicial das mudas, com o intuito de atingir um padrão de qualidade e aumentar sua produtividade.

Dentre as ferramentas utilizadas, estão as bactérias promotoras de crescimento vegetal que, devido a sua relação de mutualismo com a planta hospedeira, favorecem o crescimento das plantas através da disponibilização de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA, 2011), solubilização de fosfato (BOLLE e outros 2013), produção de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (CASSÁN e outros, 2009; DARTORA e outros, 2013) ou agirem indiretamente por meio do controle biológico de patógenos.

O nitrogênio é um nutriente muito importante na produtividade e requerido em altas quantidades, devido as suas funções como componente estrutural de macromoléculas, enzimas, síntese de clorofilas, aminoácidos, proteínas, vitaminas, citocromos, ácidos nucleicos e hormônios (TAIZ; ZEIGER, 2017).

As bactérias promotoras de crescimento são bastante eficientes na fixação biológica de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005), disponibilização de nutrientes para as culturas, e a sua utilização pode representar uma grande

estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (CONCEIÇÃO e outros, 2009).

A utilização desses microrganismos constitui uma importante vantagem, já que a interação eucarioto x procarioto não representa fonte de contaminação ambiental, e pode suprir parcialmente as necessidades de nitrogênio (N) requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor (MOREIRA e outros, 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de eucalipto, associadas a diferentes níveis de sulfato de amônio, para conhecer os benefícios ao crescimento inicial das plantas, determinando qual nível de nitrogênio e isolado bacteriano é mais eficaz para cultura do eucalipto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Universidade Estadual Paulista-UNESP- FCAV, *campus* Jaboticabal- SP, nos meses de junho a setembro de 2017, utilizando vaso em campo aberto. Foram utilizadas mudas com idade de 100 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, sendo padronizadas, quanto à altura, par de folhas e diâmetro do coleto.

Foram utilizados como tratamentos 5 isolados bacterianos e o controle sem inoculação, sendo 3 isolados provenientes do isolamento de mudas de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, realizado anteriormente na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, *campus* de Vitória da Conquista; e 2 isolados pertencentes à coleção da Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ. Foram utilizados também 4 níveis de sulfato de amônio, sendo, assim, organizado um fatorial 6 x 4, que consistiu em: B1: controle sem inoculação, B2: isolado ZAE94- Embrapa, B3: isolado AM82- Embrapa, B4: isolado UESBJMR5E-Uesb, B5: isolado UESBJNR32E-Uesb, B6: isolado UESBJMR32E-Uesb X Nível 1: 0 mg dm³ N, Nível 2: 20 mg dm³ N, Nível

3: 40 mg dm⁻³ N e Nível 4: 60 mg dm⁻³ N de sulfato de amônio, totalizando 24 tratamentos, em delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, perfazendo 72 parcelas.

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 3 ml da solução bacteriana colocados diretamente em contato com a raiz, antes do plantio, todos os isolados foram padronizados com uma população de 10⁹ UFC.

Posteriormente, as mudas foram plantadas em vasos de 20 L, com solo classificado como Latossolo vermelho eutroférico de textura argilosa. A amostra apresentou como características químicas: pH em CaCl₂ 5,4; M.O 7 g dm⁻³; P 10 mg dm⁻³; S 16 mg dm⁻³; Ca 17 mg dm⁻³; Mg 4 mmol_c dm⁻³; K 0,6 mmol_c dm⁻³; Al 0 mmol_c dm⁻³; e teve sua correção de fertilidade realizada segundo recomendações do IPEF (2005) e Sá e outros (2014).

O solo foi peneirado e homogeneizado junto aos adubos antes do plantio; o calcário foi aplicado buscando elevar a saturação de bases para 60%; o superfosfato simples foi aplicado em 100 mg dm⁻³ P; o KCl em 200 mg dm⁻³ K, sendo este adubo parcelado, com a primeira dose no plantio; e a segunda, aos 50 dias em cobertura, junto com os micronutrientes. A aplicação do sulfato de amônio foi realizada após o plantio e inoculação da bactéria.

O adubo foi aplicado em solução, com 500 mL de água para cada planta, para evitar perdas do mesmo. A irrigação das plantas foi feita em dias alternos, nos primeiros 40 dias do experimento, e, posteriormente, a irrigação foi realizada diariamente até aos 90 dias, sendo feita de acordo com a capacidade de vaso (CASAROLI; LIER, 2008) e o crescimento das plantas.

As avaliações se iniciaram aos 87 dias, com a mensuração de trocas gasosas, empregando-se o medidor portátil de fotossíntese, do tipo analisador infravermelho de gases (Infrared Gas Analyser) (IRGA LI-6400, LI-COR®, Nebraska/USA), sendo avaliada a fotossíntese líquida. Para isso, foi utilizada uma folha no terço médio de cada planta. As leituras foram feitas no horário de 08h30min às 11h00min.

Ao fim do experimento, aos 90 dias, foram avaliadas as seguintes características:

- Altura (cm) da planta, tomando-se como padrão a gema apical, medida com régua graduada;
- Diâmetro (mm) do coleto medido com paquímetro digital;
- Índice Spad, utilizando-se um clorofilômetro marca Opti-scienses, modelo CCM/200. A avaliação foi realizada em três folhas completamente expandidas e fisiologicamente maduras, localizadas na porção mediana da copa. Para cada planta, considerou-se o índice SPAD como resultante da média aritmética dessas três folhas;
- Área foliar com Medidor de Área Foliar LI-COR (modelo LI-310);
- Peso de massa seca de parte aérea, cujo material foi acondicionado em embalagens de papel e submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, durante 72 horas, e o peso foi verificado utilizando balança de precisão de 0,001 mg;
- Ntotal foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo método Semi-micro-Kjeldahl, após as folhas terem secado em estufa e posteriormente serem moídas, segundo metodologia proposta por Malavolta e outros (1997).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Normalidade (Teste de Lilliefors) e Homogeneidade (Teste de Batlett) dos dados, conforme recomendação de Banzatto & Kronka (2006). A análise de variância (ANAVA) foi realizada pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e, quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott a 5%.

Foi realizada a análise da Regressão para o parâmetro quantitativo, sendo testados os modelos linear e polinomial de 2º, levando em conta a significância do parâmetro, o ajuste biológico dos dados e o coeficiente de determinação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da altura, diâmetro, área foliar, massa seca da parte aérea, índice SPAD, fotossíntese e nitrogênio total apresentaram significância para a interação dos fatores isolados bacteriano X doses de sulfato de amônio. Procedeu-se então o desdobramento das doses dentro de cada isolado (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância, em relação às avaliações de Altura (ALT), diâmetro (DIA), área foliar (AFO), massa seca de parte aérea (MPA), índice SPAD (SPAD), fotossíntese (FOT) e nitrogênio total (NTOT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada

FV	GL	Quadrado médio						
		ALT	DIA	AFO	MPA	SPAD	FOTO	NTOT
ISOLADO	5	183,46*	0,72ns	152165,82*	610,00*	45,83*	56,19*	23,00*
DOSE	3	59,64ns	0,37ns	1830381,59*	202,57*	76,08*	34,94*	61,39*
I x D	15	119,23*	5,43*	2336025,99*	598,99*	29,37*	10,47*	7,70*
BLOCO	2	108,66	3,52	102515,84	195,22	19,47	8,22	0,46
ERRO	46	23,55	1,38	103767,54	45,78	14,7	2,68	1,16

Avaliando a ação das bactérias separadamente, na ausência de adubação nitrogenada, observa-se que o isolado UESBJMR5E foi superior aos demais nas avaliações de altura, área foliar e massa seca de parte aérea, com valores de 56,83cm; 2171,75 cm² e 49,88g, respectivamente. Já para o diâmetro e o índice SPAD, não houve diferenciação da ação dos isolados. A avaliação de fotossíntese e NTotal conseguiu diferir como superior o isolado UESBJNR32E, apresentando valores de até 55,39% superior em relação ao controle sem inoculação (Tabela 2).

Tabela 2 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), área foliar (AFO), massa seca de parte aérea (MPA), índice SPAD (SPAD), fotossíntese (FOT), nitrogênio percentual (N%) e nitrogênio total (NTOT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos

Tratamentos	ALT (cm)	DIA (mm)	AFO (cm ²)	MPA (g)	SPAD	FOT	NTOT
Controle	49,33C	7,6A	1530,66C	35,75C	32,14A	10,29D	8,44B
ZAE 94	48,16C	7,67A	1801,83B	42,75B	29,46A	12,10C	6,42C
AM 82	45,41C	7,86A	1171,41D	30,49C	29,45A	10,93D	6,47C
UESBJMR5E	56,83A	8,1A	2171,75A	49,88A	29,15A	14,40B	6,98C
UESBJNR32E	49,50C	7,52A	1320,91D	33,04C	26,22A	15,99A	9,92A
UESBJMR32E	52,25B	8,00A	1599,08C	40,87B	27,97A	13,44B	6,91C
CV (%)	9,66	15,07	20,14	17,44	16,41	12,74	14,35

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Os isolados UESBJMR5E e UESBJN32R foram caracterizados anteriormente como produtores de auxina (66,63 e 65,13) e ambos como responsivos à fixação biológica de nitrogênio, e assimilados morfologicamente a bactérias do gênero *Azospirillum*, caracterizando-se como promotores de crescimento de plantas.

Corroborando o presente trabalho, Isawa e outros (2010) e Bao e outros (2013), usando estirpes de *Azospirillum* como inoculante líquido em campo e em vaso, observaram também crescimento de parte aérea e resposta positiva para produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio.

Após o estudo da média dos isolados bacterianos, foi estudada a tendência dos dados na regressão, levando em consideração o fenômeno biológico após a inoculação associada à adubação nitrogenada, e o comportamento matemático.

A altura das plantas é apresentada na Figura 1A. As médias do isolado UESBJMR32E apresentaram um comportamento quadrático, com um ponto

de máxima de 61,37 cm no nível de 26,20 mg dm⁻³ N, e as médias do isolado UESBJMR5E apresentaram um comportamento linear crescente com 62,66 cm de altura no nível de 60 mg dm⁻³ N.

Na figura 1B está demonstrado o comportamento quadrático para o isolado nativo UESBJMR32E e linear crescente do isolado nativo UESBJMR5E, para diâmetro do coleto. As médias do isolado UESBJMR32E apresentam um ponto de máxima de 9,73 cm na dose de 27,42 mg dm⁻³ N. As médias do isolado UESBJMR5RE apresentam um valor máximo de 9,52 cm na dose de 60 mg dm⁻³ N. Isso demonstra, em ambos os parâmetros, a eficiência do isolado nativo UESBJMR32E na presença de um nível inferior de nitrogênio e, mesmo assim, ativando o crescimento da planta.

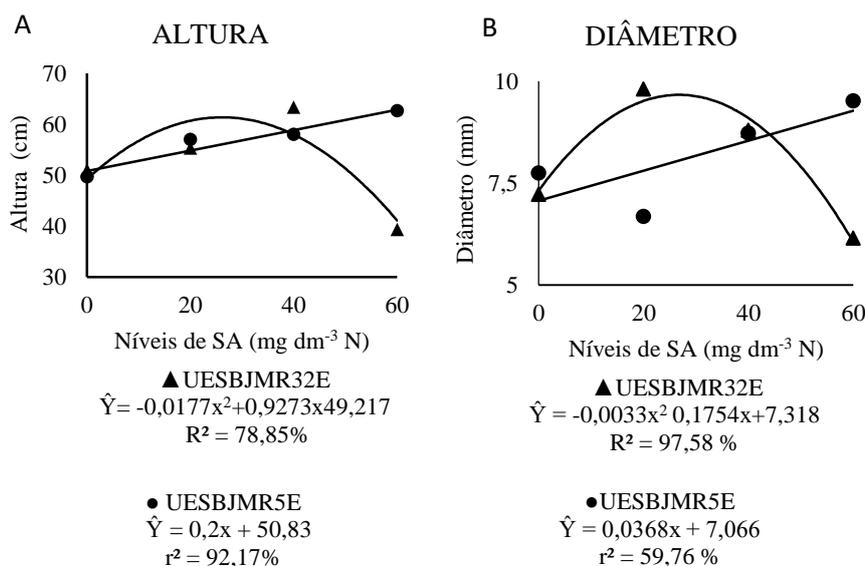


Figura 1 – Altura e Diâmetro de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados bacterianos UESBJMR32E e UESBJMR5E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio

Os resultados obtidos para altura e diâmetro das plantas ressaltam a necessidade de um aporte inicial de nitrogênio para que a planta se desenvolva, comece a liberar exsudatos e, assim, a bactéria comece a realizar a simbiose e, posteriormente, ocasionar uma resposta favorável.

Estudos anteriores com os isolados nativos UESBJMR5E, UESBJNR32E e UESBJMR32E demonstraram a produção de auxina de 66,63; 65,13 e 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, e todos os três isolados também apresentaram resposta positiva para avaliação qualitativa de fixação biológica de nitrogênio.

Por conseguinte, a resposta obtida em altura e diâmetro é explicada pela combinação de fatores: o nitrogênio proporciona a síntese de RNA e DNA, que favorece a produção de novos tecidos; e as bactérias promotoras do crescimento vegetal apresentam a capacidade de produzir hormônios, principalmente auxinas, giberelinas e citocininas, sendo que a auxina é responsável pelo alongamento e diferenciação celular, promovendo alongamento celular do caule nas plantas, sendo sintetizado principalmente nos meristemas apicais caulinares (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A tendência dos dados para área foliar é exposta na Figura 2. O isolado UESBJMR5E apresentou um comportamento linear crescente com valor de 3060,20 cm^2 no nível de 60 mg dm^{-3} N; o isolado UESBJNR32E, um comportamento linear decrescente com valor de 1954,76 cm^2 no nível de 0 mg dm^{-3} N; e as médias do isolado UESBJMR32E apresentaram um comportamento quadrático com um ponto de máxima de 3029,76 cm^2 no nível de 29,50 mg dm^{-3} N.

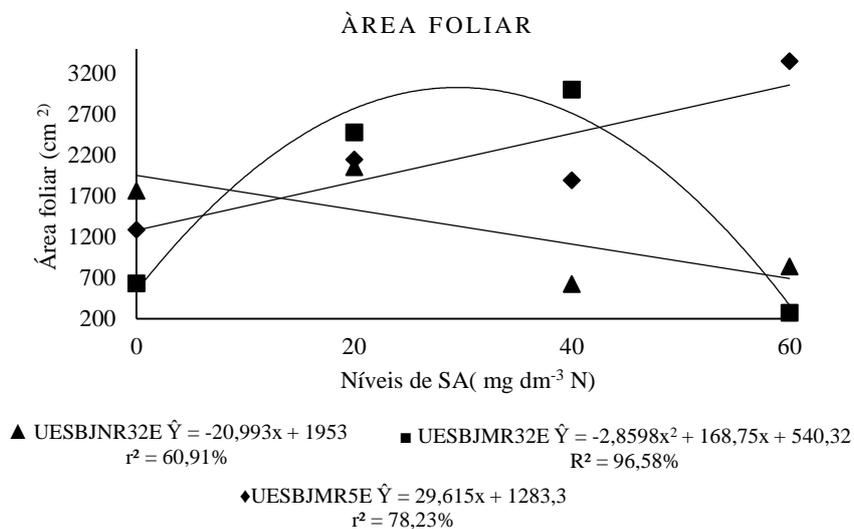


Figura 2 – Área foliar de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados UESBJNR32E, UESBJMR32E e UESBJMR5E associados a diferentes níveis de sulfato de amônio

A expansão da área foliar pode ser explicada como uma resposta ao crescimento vegetal ocasionado pelas bactérias e sua produção de citocininas. Segundo Taiz; Zeiger (2017), muitas bactérias produzem os tipos de citocinina: trans-zeatina, cis-zeatina e seus ribosídeos, que induzem a divisão do tecido, todas essas estruturas apresentam, em sua composição, o nitrogênio, o que evidencia mais uma vez o benefício dessa associação com as bactérias e a disponibilização do nutriente para a planta, que resulta na condução de diversas rotas metabólicas.

As médias dos isolados UESBJMR32E e UESBJMR5E, e a massa seca apresentaram comportamento quadrático (Figura 3). Para o primeiro isolado, o ponto de máxima ficou com 59,73g no nível de 26,84 mg dm⁻³ N; e o segundo isolado, o ponto foi obtido em 59,24 g com o nível de 50,96 mg dm⁻³ N, com a superioridade do isolado UESBJMR32E.

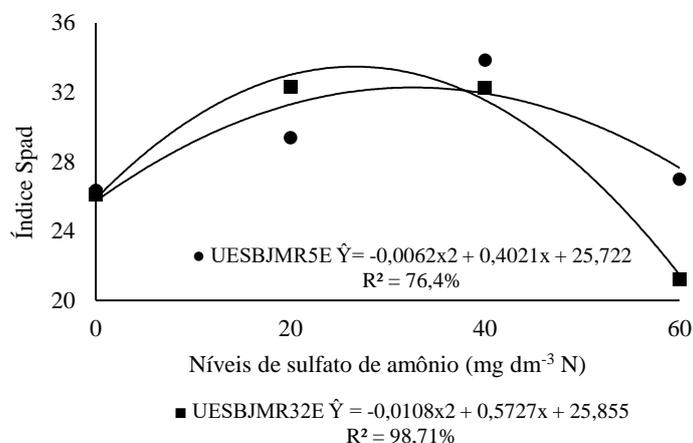


Figura 4 – Índice SPAD de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com os isolados UESBJMR5E e UESBJMR32E, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio

Geralmente, o índice SPAD cresce linearmente com o uso da adubação nitrogenada, já que este quantifica a intensidade da cor verde das folhas que se correlaciona ao teor de nitrogênio no tecido. Neste trabalho, a resposta máxima foi no nível de 32,42 mg dm⁻³ N, resposta que se equivale às demais características que proporcionaram valores ótimos nos níveis intermediários de 25 a 40 mg dm⁻³ N.

Os valores já eram esperados visto que, para eucalipto em solo com matéria orgânica (MO) de 7 g dm⁻³ igual ao do experimento, a dose ideal de N é de 60kg ha⁻¹ (IPEF, 2005), se o ponto máximo fosse em níveis superiores, provavelmente, ocasionaria respostas de excesso de nitrogênio, alterando o transporte de carboidratos produzidos, interferindo no desenvolvimento da planta.

A tendência dos dados para Ntotal apresentou resposta quadrática para o isolado UESBJNR32E (Figura 5A), com um ponto máximo de 1,85% N no nível de 44,66 mg dm⁻³ N, e ponto máximo de 12,78 g/kg N no nível de 39,75 mg dm⁻³ N, respectivamente.

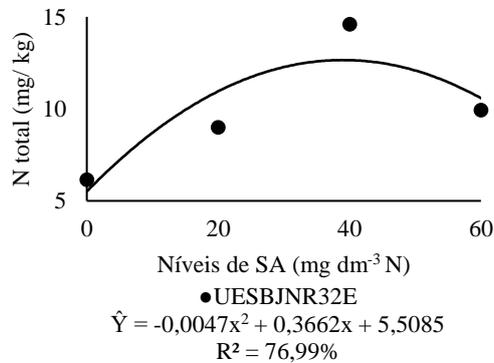


Figura 5 – Nitrogênio total em *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com o isolado UESBJNR32E, associado a diferentes níveis de sulfato de amônio

A resposta para o acúmulo de nitrogênio na planta pela bactéria UESBJNR32E se deve ao fato de sua resposta positiva para fixação biológica de nitrogênio, e também por ser similar ao gênero *Herbaspirillum* spp., que são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo transferir mais eficientemente compostos nitrogenados para as plantas e não sofrerem limitações em fontes ricas em carbono (OLIVARES e outros, 1997).

Estudos realizados com diferentes espécies de eucalipto, *Eucalyptus globulus*, *E. regnans* e *E. nitens*, registraram maior assimilação de N, quando este é absorvido preferencialmente sob a forma de NH_4^+ (SHEDLEY e outros, 1995; GARNETT; SMETHURST, 1999; PFAUTSCH e outros, 2009). E essa resposta ocorre, uma vez que, segundo Hachiya e outros (2012), a absorção sob a forma de N-NH_4^+ demanda menor quantidade de energia, pois dispensa as fases de redução, que são requeridas quando ocorre absorção de N-NO_3^- ; e, em formas amoniacais, o nitrogênio já entra direto nos esqueletos de carbono, então, o tipo de adubo utilizado responde ao efeito do teor de nitrogênio neste trabalho.

Entretanto, a resposta à absorção do N- NH_4^+ deve ser em doses menores, como observado no trabalho com o isolado UESBJNR32E, já que o amônio tem alto poder acidificante da rizosfera, o que interfere na aquisição de alguns nutrientes, e deve ser imediatamente metabolizado, devido ao seu efeito tóxico, quando acumulado nas plantas (PRADO, 2008). Além disso, a acidificação da rizosfera pode causar a redução da população de bactérias benéficas que necessita de condições ótimas, assim como a planta para sua sobrevivência.

Os valores referentes à fotossíntese se ajustaram ao modelo linear crescente para o tratamento controle e à bactéria AM82, com valores máximos de 12,30 e 12,25 $\mu\text{mol Co}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Figura 6).

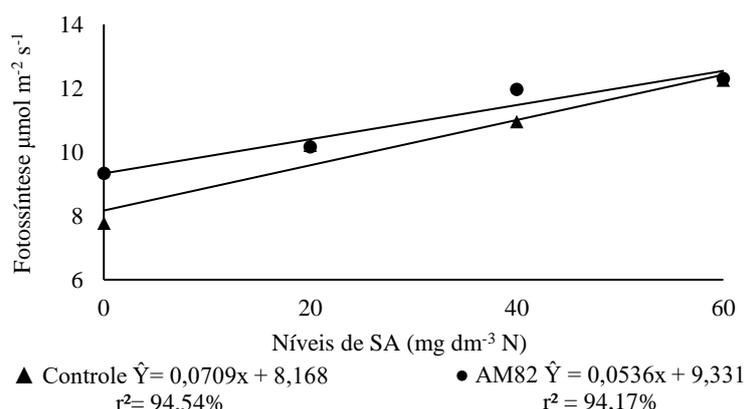


Figura 6 – Fotossíntese em *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, inoculado com a bactéria AM82 e com tratamento controle, associados a diferentes níveis de sulfato de amônio

Os valores de fotossíntese, no maior nível de nitrogênio, era o esperado, visto que a fotossíntese é regida pela ação da enzima Rubisco, que é representante de 50% do total das proteínas solúveis presentes na folha (PRADO, 2008). Sabe-se que a fotossíntese é determinada, dentre outros fatores, pela quantidade de nitrogênio do tecido (MENDES e outros, 2013). Por conseguinte, quanto maior o aporte de nitrogênio disponível para a planta,

maior será a produção de enzimas e proteínas que irão auxiliar neste e em diversos outros processos da planta.

Os isolados bacterianos UESBJNR32E, UESBJMR32E e UESBJMR5E apresentaram os melhores resultados em todas as características. Estes são isolados similares aos gêneros *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp., respectivamente, que, segundo Baldani e outros (2002), são bactérias endofíticas.

Em ambiente endofítico e protegido, as bactérias têm um melhor desenvolvimento devido a sua menor competição com outros isolados e maior eficiência destes na transferência de compostos essenciais ao desenvolvimento da planta (DOBBELAERE e outros, 2003). Além disso, elas estão em uma área como caule, interior de raízes e folhas, que tem a maior disponibilidade em fontes ricas em carbono, o que favorece seu crescimento e colonização da planta.

Outro fator muito importante que pode ter otimizado os resultados é que estes isolados bacterianos são nativos, isolados anteriormente de *Eucalyptus urophylla* clone AEC 144, mesma espécie do clone utilizado neste trabalho, favorecendo, assim, o processo de mutualismo e a especificidade da bactéria com a planta.

Segundo Mahaffee e outros (1997), a capacidade de colonização do tecido pelas bactérias é ligada, principalmente, à interação do genótipo do vegetal e do microrganismo, algo que pode estar relacionada com a coexistência natural da planta hospedeira/bactéria ou com o compartilhamento metabólico entre plantas hospedeiras e bactérias (HOLL; CHANWAY, 1992).

4 CONCLUSÕES

Os isolados nativos UESBJMR5E, UESBJMR32E, UESBJNR32E influenciaram as características de altura, diâmetro, área foliar, massa seca de parte aérea, N total, fotossíntese, SPAD.

O isolado UESBJMR32E proporcionou os maiores incrementos em altura, diâmetro, área foliar, massa seca de parte aérea, nos níveis de 26,20; 27,42; 29,50; 26,84 mg dm⁻³ N, respectivamente.

O isolado UESBJNR32E proporcionou os maiores incrementos em N% e Ntotal, nos níveis de 46,60; 39,75 mg dm⁻³ N, respectivamente.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimento pela concessão de bolsa à FAPESB; e à CAPES, pela concessão da bolsa durante o programa PROCAD.

Gratidão também à UESB e à UNESP, pela infraestrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 2, p. 417-423. 2002.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579. 2005.

BANZATTO, D. A, KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

BOLLE, S.; GEBREMIKAEL, M. T.; MAERVOET, V. DE NEVE S. Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 705-714. 2013.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum*

E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p.28–35. 2009.

CASAROLI, D.; VAN LIER, Q. J. Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.59-66, 2008.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v.39, p.1880-1883. 2009.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, p.1023 - 1029.2013.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p.107-149. 2003.

FERREIRA DF. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 2011, 35 (6): 1039-1042.

GARNETT, T.P.; SMETHURST, P. J. Ammonium and nitrate uptake by *Eucalyptus nitens*: the effect of pH and temperature. **Plant and Soil**, v. 214, p.133-140. 1999.

GOMIDE, J.L.; FANTUZZI, N.H.; REGAZZI, A.J. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. **Revista Árvore**, v.34, p.339-344. 2010.

GONÇALVES, J. L. M. Documentos florestais, **Recomendações de adubação para Eucalyptus, Pinus e Espécies nativas**: In IPEF, 2005.

HOLL, F. B.; CHANWAY, C.P. Rhizosphere colonisation e seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38. p. 303-308. 1992.

HUNGRIA M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. Embrapa Soja. Documentos, 325.

IBÁ, **Indústria Brasileira de árvores**. Relatório 2017. 80p.

KOPRIVOVA, A.; SUTER, M.; CAMP, R. O DE.; BRUNOLD, C.; KOPRIVOVA, S. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*, **Plant Physiology**, v.122 , p. 737- 746. 2000.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p.298–300. 2000.

MAHAFFEE, W.F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUUKDE, J. W.L.; WAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M.; KLOEPPER, J.W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and a transgene marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63: p. 1617-1622. 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, Respiração, Relações Hídricas e Nutrição Mineral**. 3 ed. Viçosa, Editora UFV. 2009.

MENDES, K. R.; MARENCO, R. A.; MAGALHÃES, N. S. Crescimento e eficiência fotossintética de uso do nitrogênio e fósforo em espécies florestais da Amazônia na fase juvenil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 707-716, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99. 2010.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe diseasesusceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135: p. 723-737. 1997.

PRADO, R.M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

PATTEN, C. L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, p 207–220. 1996.

PFAUTSCH, S.; RENNENBERG, H.; BELL, T. L.; ADAMS, M. A. Nitrogen uptake by *Eucalyptus regnans* and *Acacia* spp. - preferences, resource overlap and energetic costs. **Tree Physiology**, v.29, p. 389-399. 2009.

PORTO, M.; PUIATTI, M.; FONTES, P. C. R.; CECON, P. R.; ALVES, J. C.; ARRUDA, J. A. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura da abobrinha. **Horticultura Brasileira**, v.29, p. 311-315. 2011.

PRIGENT-COMBARET, C.; BLAHA, D.; POTHIER, J. F.; VIAL, L.; POIRIER, M. A.; WISNIEWSKI, D. F.; MOËNNE, L. Y. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucineresponsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65 (2), p.202- 219. 2008.

SÁ, A. F. L.; VALERI, S.V.; CRUZ, M.C P.; BARBOSA JC, REZENDE GM, TEIXEIRA MP. Effects of potassium application and soil moisture on the growth of *Corymbia citriodora*. **Cerne**, v. 20 (4), p. 645-651. 2014.

SHEDLEY, E.; DELL, B.; GROVE, T. Diagnosis of nitrogen deficiency and toxicity of *Eucalyptus globulus* seedlings by foliar analysis. **Plant and Soil**, v. 177(2), p. 183-189. 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

CAPÍTULO IV

CRESCIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO ASSOCIADO À RIZOBACTÉRIAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA

CRESCIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO ASSOCIADO À RIZOBACTÉRIAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de rizobactérias promotoras de crescimento e uma mistura dessas bactérias associadas à adubação nitrogenada, determinando qual dose de sulfato de amônio e qual isolado bacteriano promovem o crescimento vegetal no eucalipto, nas condições do Sudoeste da Bahia. O experimento foi conduzido na UESB, nos meses de junho a setembro de 2017, em campo aberto. Foram utilizadas mudas de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, como tratamento, sendo 3 isolados bacterianos de Eucalipto, 1 mistura de isolados, 1 bactéria do gênero *Rizobium* e o controle sem inoculação. Também foram utilizadas 3 doses de sulfato de amônio, organizados em um fatorial 6 x 3, totalizando 18 tratamentos, em delineamento em blocos casualizados (DBC), com 3 repetições, perfazendo 54 parcelas. Foi colocado 3ml de inoculante líquido na raiz das plantas, no dia do plantio, e a adubação nitrogenada foi realizada em seguida, em solução com 500ml de água. Ao fim de 90 dias, foram avaliadas a Altura da planta, Diâmetro do coleto, Número de brotações das plantas, Peso de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, Razão de massa seca de parte aérea e raiz. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste de Scott Knott a 5%, para avaliação do desdobramento dos isolados dentro de cada nível de N. Os isolados bacterianos UESBJMR5, UESBJMR21E promoveram crescimento das plantas de eucalipto na ausência de adubação nitrogenada, e o isolado UESBJNR32E promoveu crescimento em altura no nível 40 mg dm⁻³ N.

PALAVRAS-CHAVE: promoção de crescimento; sulfato de amônio; bactérias diazotróficas.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the use of growth promoting rhizobacteria and a mixture of these bacteria, associated with nitrogen adduction, determining which dose of ammonium sulphate and which bacterial isolate promote plant growth in eucalyptus, in the Southwest of Bahia. The experiment was conducted at the UESB, from June to September 2017, in the open field. Seedlings of *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 were used as treatment, 3 bacterial isolates of Eucalyptus, 1 mixture of isolates, 1 bacterium of the genus *Rizobium* and the control without inoculation were used. Three doses of ammonium sulphate were also used, and a 6 x 3 factorial was organized, totaling 18 treatments, in DBC with 3 replicates, making 54 plots. 3ml of liquid inoculant was placed in the root of the plants on the day of planting, and the nitrogen fertilization was then carried out in solution with 500ml of water. At the end of 90 days, were evaluated the height of the plant, diameter of the collection, number of shoots of the plants; Weight of dry mass of aerial part and dry mass of root, Ratio of dry mass of

aerial part and root. Statistical analysis of the data was carried out with the Scott Knott test at 5% to evaluate the unfolding of the isolates within each level of N. Bacterial isolates UESBJMR5, UESBJMR21E promoted growth of eucalyptus plants in the absence of nitrogen fertilization, and the isolate UESBJNR32E promoted growth in height at level 40 mg dm⁻³ N.

KEYWORDS: promotion of growth; ammonium sulfate; diazotrophic bacteria.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma cultura que apresenta grande possibilidade de expansão geográfica e econômica, visto que possui uma vasta diversidade de materiais genéticos adaptados às mais diversas condições edafoclimáticas, e com grande variedade de uso de sua matéria prima (PINTO e outros, 2011; QUEIROZ e outros, 2009).

Alguns entraves podem dificultar a expansão da cultura, como o custo oneroso em produtos químicos, destacando-se, dentre eles, o uso do nitrogênio, pois a prática de adubação é um fator indispensável, uma vez que a cultura apresenta uma alta demanda de nitrogênio até a formação da copa (VEZZANI e outros, 2001).

Sala e outros (2007) indica que, principalmente nos países de clima tropical, a agricultura é mais dependente do emprego de fertilizantes nitrogenados, devido à grande quantidade de chuvas e à rápida decomposição da matéria orgânica, pois grande parte do nitrogênio (N) é perdida via lixiviação, desnitrificação e pela imobilização microbiana.

Diante disso, produtos ou inovações biotecnológicas devem ser estudados a fim de minimizar os custos de produção e reduzir o uso de produtos químicos, que, a cada vez mais, se acumulam no meio ambiente, trazendo danos irreversíveis.

Nesse contexto, o uso de Bactérias promotoras de crescimento (BPCP), que realizam a fixação biológica do nitrogênio, é uma alternativa viável e agronomicamente sustentável.

O uso de BPCP's tem permitido a substituição total ou parcial de fertilizantes nitrogenados, possibilitando melhorar as condições ambientais dos solos agrícolas e reduzir os impactos ambientais negativos do uso desses insumos, além das outras diversas formas de uso, devido sua diversidade de funções, como produção de hormônios (AHEMAD; KHAN, 2012; ZAHIR e outros, 2010), solubilização de fosfato (MEHNAZ e outros, 2010; WANI e outros, 2007), produção de sideróforos (AHMAD e outros, 2008; GANESAN, 2008) e mobilização de metais pesados (MA e outros, 2011; DARY e outros, 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de rizobactérias promotoras de crescimento e uma mistura dessas bactérias associadas à adução nitrogenada, determinando qual nível de sulfato de amônio e qual isolado bacteriano promovem o crescimento vegetal no eucalipto, nas condições do Sudoeste da Bahia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista-BA, nos meses de junho a setembro de 2018, em campo aberto. Foram utilizadas mudas com idade de 80 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144, sendo padronizadas quanto à altura, par de folhas e diâmetro do coleto.

Foram utilizados como tratamentos 3 isolados bacterianos de Eucalipto, 1 mistura de isolados, 1 bactéria do gênero *Rizobium* e o controle sem inoculação. Foram utilizados também 3 níveis de sulfato de amônio, organizados em um fatorial 6 x 3, que consistiu em: T1: UESBJMR21E, T2: UESBJMR5E, T3: UESBJNR32E, T4: rizóbio BR3267, T5: Mistura 1 (UESBJMR5E + UESBJNR32E+ UESBJMR21E), T6: Controle sem inoculação X (0; 20 e 40 mg dm³ N de sulfato de amônio), totalizando 18 tratamentos, em delineamento em blocos casualizados, com 3 blocos, perfazendo 54 parcelas.

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 3 ml da solução bacteriana colocados diretamente em contato com a raiz, antes do plantio, sendo que todos os isolados foram padronizados com uma população de 10^9 u.f.c.

Posteriormente, as mudas foram plantadas em vasos de 18 litros, com solo representativo do campo agropecuário da UESB. A amostra apresentou como características químicas: pH em H_2O 5,0; P 2,0 $mg\ dm^{-3}$; Ca 1,0 $Cmol_c\ dm^{-3}$, Mg 0,8 $Cmol_c\ dm^{-3}$; K 0,18 $Cmol_c\ dm^{-3}$; Al 0,2 $Cmol_c\ dm^{-3}$, V 41%, e teve sua correção de fertilidade realizada segundo recomendações de Sá e outros (2014).

O calcário foi aplicado buscando elevar a saturação de bases para 60%. A aplicação do sulfato de amônio foi realizada após o plantio e inoculação da bactéria.

O adubo foi aplicado em solução, com 500 mL de água para cada planta, para evitar perda do mesmo. A irrigação das plantas foi feita em dias alternados, sendo feita de acordo com a capacidade de vaso (CASAROLI; LIER, 2008) e o crescimento das plantas.

Ao fim do experimento, aos 90 dias, foram avaliadas as seguintes características: Altura da planta (cm), tomando-se como padrão a gema apical, medida com régua graduada; Diâmetro do coleto (mm), medido com paquímetro digital; Número de brotações das plantas; Peso de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz (g), cujo material foi acondicionado em embalagens de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de $65^{\circ}C$, durante 72 horas, e o peso foi verificado utilizando balança de precisão de 0,001 mg; Razão de massa seca de parte aérea e raiz.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Normalidade (Teste de Lilliefors) e Homogeneidade (Teste de Batlett) dos dados, conforme recomendação de Banzatto & Kronka (2006). A análise de variância (ANAVA) foi realizada pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA,

2011), e quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características estudadas apresentaram significância na interação dos fatores Bactérias X Níveis de nitrogênio, por este motivo, procedeu-se o desdobramento da interação, avaliando, posteriormente, a ação das bactérias dentro de cada nível (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância, em relação às avaliações de altura (ALT), diâmetro (DIA), número de brotações (BROT), massa seca de parte aérea (MPA), massa seca de raiz (MRA), razão massa seca de raiz e parte aérea (MPARA) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos, associado à adubação nitrogenada

FV	GL	QUADRADO MÉDIO					
		ALT	DIA	BROT	MPA	MRA	MPARA
ISOLADO	5	38,61*	0,20ns	17,49ns	33,33ns	10,45*	1,14*
DOSE	2	102,37*	11,79*	324,79*	143,03*	44,13*	0,13ns
I x D	10	22,31*	2,48*	32,59*	22,86*	9,69*	0,34*
BLOCO	2	24,34	0,01	21,46	6,15	6,4	0,17
RESÍDUO	34	8,13	0,82	12,61	14,71	2,92	0,21
CV (%)		6,20	16,34	24,66	23,65	18,28	25,54

A altura sem a presença de adubação foi superior com os isolados UESBJMR21E, UESBJMR5E e o rizóbio, sendo que os isolados nativos de eucalipto (47,33 cm) apresentaram um incremento de 15,43% em relação ao controle. Na dose de 20, não houve diferença entre os isolados e, no nível de 40 mg dm⁻³ N, os isolados UESBJNR32E, UESBJMR5E, UESBJMR21E e o tratamento controle foram superiores à inoculação com rizóbio e à mistura de isolados (Tabela 2).

Tabela 2 – Altura (ALT), diâmetro (DIA), número de brotações (BROT) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e mistura de rizobactérias

TRATAMENTOS	ALT (cm)			DIA(mm)			BROT		
	0	20	40	0	20	40	0	20	40
CONTROLE	41,00B	50,33A	50,66A	4,66A	5,66A	6,00A	13,00A	14,66A	12,00B
UESBJMR21E	47,33A	45,00A	51,50A	5,66A	5,66A	5,33B	12,00A	15,33A	21,00A
UESBJMR5E	47,33A	46,00A	50,66A	4,66A	4,66A	6,66A	14,33A	12,33A	18,00A
UESBJNR32E	40,66B	44,66A	48,66A	3,66A	5,66A	8,00A	8,66A	14,33A	23,00A
RIZOBIUM	46,33A	43,33A	46,33B	4,33A	5,66A	6,33A	8,66A	13,00A	22,00A
MISTURA 1	40,00B	45,33A	43,33A	5,0A	6,33A	5,33B	9,33A	8,66A	19,00A

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Em relação ao diâmetro das plantas, não houve diferença estatística entre os isolados, quando foram empregados os níveis 0 e 20 mg dm⁻³ N; e no nível de 40 mg dm⁻³ N, os isolados UESBJMR5E, UESBJNR32E, rizóbio e o controle foram diferentes dos demais (Tabela 2).

A avaliação de diâmetro, conforme Novais e outros (2014), é muito importante, pois é usada para estimar a sobrevivência de plantas de espécie florestal no campo, destacando-se, neste trabalho, a importância do isolado UESBJNR32E (8,00 mm), no nível 40 mg dm⁻³ N, que embora tenha se igualado ao controle, estatisticamente ele promoveu um incremento em diâmetro de 33,33% em relação ao controle.

O número de brotações não apresentou significância quanto ao uso dos isolados, nos níveis 0 e 20 de mg dm⁻³ N, entretanto, no nível 40 mg dm⁻³ N, o uso de todos os isolados foram superiores ao controle, sendo que o UESBJNR32E promoveu o maior incremento, com valor de 91,66% superior ao controle (Tabela 2).

Os isolados nativos de eucalipto UESBJMR21E, UESBJMR5E e UESBJNR32E, que promoveram resposta no crescimento das plantas apresentadas anteriormente, foram caracterizados como produtores de auxina (65,77; 66,63; 65,13, respectivamente). Sabe-se que a auxina produzida pelas

bactérias age como uma molécula ativadora das interações microbianas, tanto na patogênese quanto na fitoestimulação (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011), ocasionando, assim, respostas no crescimento.

A produção de auxinas pelas bactérias altera o pool de auxina acessível à planta, e isso poderá afetar a divisão celular, extensão, diferenciação, aumento da taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz; o controle de processos de crescimento vegetativo, inicia a formação de raízes adventícias, afeta a fotossíntese, formação de pigmentos, biossíntese de vários metabólitos e resistência a estresses condições (GLICK, 2012), e essas funções elucidam a resposta do presente trabalho.

Tabela 3 – Massa seca de parte aérea (MPA), massa seca de raiz (MRA), Razão massa seca de parte aérea sobre massa seca de raiz (MPARA) do clone AEC144 de *Eucalyptus urophylla*, sob inoculação de isolados bacterianos e mistura de rizobactérias

TRATAMENTOS	MPA(g)			MRA(g)			MPARA		
	0	20	40	0	20	40	0	20	40
CONTROLE	13,27B	17,23A	14,98A	9,80A	12,62A	10,33A	1,38B	1,40A	1,44A
UESBJMR21E	19,24A	20,49A	19,42A	6,09B	9,01B	9,92A	3,08A	2,37A	1,95A
UESBJMR5E	16,73A	15,50A	19,07A	10,23A	11,62A	9,14A	1,62B	1,33A	2,19A
UESBJNR32E	9,17B	16,31A	21,79A	5,40B	10,09B	12,98A	1,68B	1,69A	1,65A
RIZOBIUM	9,41B	15,40A	19,31A	5,22B	9,43B	10,50A	1,99B	1,64A	1,83A
MISTURA 1	11,83B	13,91A	18,89A	8,63A	7,94B	9,65A	1,39B	1,75A	1,95A

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Os valores de massa seca de parte aérea foram influenciados pela inoculação somente no nível 0 de N, com os isolados UESBJMR21E e UESBJMR5E, sendo superiores aos demais, e com valores de 44,98 e 26,07% superior ao controle, respectivamente (Tabela 3).

A massa seca de raiz no nível 0 de N apresentou significância com o uso dos isolados UESBJMR5E, mistura 1 e controle, no nível 20 mg dm⁻³ N. Os isolados UESBJMR5E e o controle foram superiores aos demais, e o último nível não apresentou diferença entre os isolados (Tabela 3).

Segundo Marschner (2012), o crescimento radicular pode ser favorecido em solos deficientes de nutrientes, notadamente de N, pois a planta tenta alocar as reservas, inicialmente, para o crescimento das raízes (SOUZA; FERNANDES, 2006), a fim de que a planta consiga explorar mais o solo em busca dos nutrientes, corroborando o presente trabalho, no qual o controle sem inoculação promoveu aumento significativo da massa seca de raiz.

Semelhantemente ao presente estudo, Rocha (2015) e Jesus e outros (2012) observaram que o nitrogênio promoveu maior acúmulo de massa seca das mudas formadas de *E. grandis* x *E. urophylla*, e em plantas adultas de *E. urophylla*, a adubação nitrogenada incrementou o volume do tronco e a matéria seca da parte aérea, respectivamente.

O isolado UESBJMR5E, que propiciou maiores acúmulos de massa seca de parte aérea e raiz no nível 0 de N, foi caracterizado anteriormente, além da produção de auxina (66,63), como fixador de nitrogênio, o qual é responsável pela produção de RNA e DNA, que promove criação de novos tecidos, ocasionando, assim, maior acúmulo de massa.

A reposta em acúmulo de massa seca de raiz por este isolado é justificada pela ação da auxina, que é responsável principalmente por crescimento de raízes adventícias e formação de novas raízes.

A razão massa seca da parte aérea sobre raiz só apresentou diferença significativa com o uso do isolado UESBJMR21E, no nível 0 de N, sendo que os demais níveis não apresentaram diferença significativa (Tabela 3).

Segundo Paiva; Guerrero (2006), o índice MPARA é considerado adequado, quando seu valor é igual a dois ou um pouco superior, pois, assim, existe um equilíbrio maior entre o crescimento da parte aérea e da raiz das plantas.

Observa-se que somente a utilização do isolado UESBJMR21E, no nível 20 g dm⁻³ N (2,37), e do isolado UESBJMR5E, no nível de 40 mg dm⁻³ N (2,19), conseguiram promover esse equilíbrio, sendo que o isolado UESBJMR5E se aproximou mais de 2.

A junção das características de produção de auxina e fixador de nitrogênio, em um mesmo isolado (UESBJMR5E), possivelmente, faz com que a planta consiga promover uma melhor partição de fotoassimilados, promovendo tanto a produção e expansão de novos tecidos, e a expansão do sistema radicular.

Por fim, é importante salientar que diversos estudos mostram a importância da adubação nitrogenada para favorecer o crescimento de plantas (ROCHA e outros, 2015; MARSCHENER, 2012; CARVALHO e outros, 2011; OLIVEIRA, 2013). Entretanto, pode-se constatar no presente trabalho que o uso dos isolados nativos UESBJMR5 e UESBJM21E, sem a presença de adubação, conseguiu promover o crescimento das plantas.

Essa resposta positiva dos isolados nativos de eucalipto vem afirmar cada vez mais a importância do uso e do estudo de bactérias promotoras do crescimento de plantas, que conseguem, devido à junção de seus diversos mecanismos de promoção, favorecer o crescimento das plantas na ausência da adubação ou mesmo em uma dose menor que as comumente utilizadas.

4 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos UESBJMR5 e UESBJMR21E promoveram crescimento das plantas de eucalipto na ausência de adubação nitrogenada, e o isolado UESBJNR32E promoveu crescimento em altura no nível $40 \text{ mg dm}^{-3} \text{ N}$.

5 REFERÊNCIAS

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Effects of pesticides on plant growth promoting traits of Mesorhizobium strain MRC4. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.11, p. 63–71. 2012.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S., Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p. 173–181. 2008.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2008. 237 p.

CARVALHO, C. M.; VIANA, T. V. A.; MARINHO, A. B.; LIMA JÚNIOR, L. A.; AZEVEDO, B. M.; SOUSA, G. G. Adubação nitrogenada e crescimento inicial do pinhão mando irrigado. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 5, n. 4, p. 286 - 295, 2011.

CASAROLI, D.; VAN LIER, Q. J. Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.59-66, 2008.

DERBLAI CASAROLI, D.; LIER, Q. J. Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 32:59-66, 2008.

DARY, M., CHAMBER-PE´ REZ, M.A., PALOMARES, A.J., PAJUELO, E. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal Hazardours Matererials**, v. 177, p. 323–330. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GANESAN, V. Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. **Current Microbiology**, v. 56, p. 403–407. 2008.

GLICK, B. R. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 2012.

GONÇALVES, J. L. M. Documentos florestais, **Recomendações de adubação para Eucalyptus, Pinus e Espécies nativas**: In IPEF, 2005.

JESUS, G. L.; BARROS, N. F.; SILVA, I. R.; NEVES, J. C. L.; HENRIQUE, E. P.; LIMA, V. C.; FERNANDES, L. V.; SOARES, E. M. B. Doses e fontes de nitrogênio na produtividade do eucalipto e nas frações da matéria orgânica em solo da região do cerrado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 201-214, 2012.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; VICENTE, J.A.; FREITAS, H. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. **International Journal of Phytoremediation**, v.13, p. 126–139.2011.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3ª ed. Austrália: Elsevier, 2012, 551p.

MEHNAZ, S., BAIG, D.N., LAZAROVITS, G., Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 1614–1623. 2010.

OLIVEIRA, D. F. S. **Crescimento e produção de pinhão manso em função da fertilização nitrogenada e adição de resíduos sólidos orgânicos**. 2013. 40 p. Monografia (Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Catolé do Rocha, 2013.

PINTO, S. I. C.; FURTINO NETO, A. E.; NEVES, J. C. L.; MORETTI, B. S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35 n. 2, p. 523-533, 2011.

QUEIROZ, M. M.; LELES, P. S. S.; OLIVEIRA NETO, S. N.; FERREIRA, M. Â. Comportamento de materiais genéticos de eucalipto em Paty do Alferes, RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 16, n. 1, p. 01-10, 2009.

ROCHA, J. H. T.; BACKES, C.; BORELLI, K.; PRIETO, M. R.; SANTOS, A. J. M.; GODINHO, T. O. Produtividade do minijardim e qualidade de miniestacas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (I-224) em função de doses de nitrogênio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 273-279, 2015.

SÁ, A. F. L.; VALERI, S. V.; CRUZ, M. C. P.; BARBOSA, J. C.; REZENDE, G. M.; TEIXEIRA, M. P. Effects of potassium application and soil moisture on the growth of *Corymbia citriodora*. **Cerne**, v. 20 (4), p. 645-651.2014.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactéria Diazotróficas Associadas a Plantas Não-leguminosas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. cap.6, p.97-115.

SOUZA, S. R.; FERNADES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Org.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2011.

VEZZANI, F. M.; TEDESCO, M. J.; BARROS, N. F. Alterações dos nutrientes no solo e nas plantas em consórcio de eucalipto e acácia negra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 225-231, 2001.

WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Co inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. **Acta Agron. Hung.** v. 55, p.315–323. 2007.

ZAHIR, Z. A.; SHAH, M. K.; NAVEED, M.; AKHTER, M. J. Substratedependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 1288–1294. 2010.