UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Eucalyptus benthamii*, POR BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GIOVANNA MARCOLIN

IRATI-PR

2016

GIOVANNA MARCOLIN

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Eucalyptus benthamii*, POR BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS.

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

Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia

Orientador

Profª Drª Kátia Cylene Lombardi

Coorientadora

IRATI-PR

2016

Catalogação na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

MARCOLIN, Giovanna.

M321p Promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*, por bactérias solubilizadoras de fosfatos / Giovanna Marcolin. – Irati, PR : [s.n], 2016.
52 f.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia
Coorientadora: Profª Drª Kátia Cylene Lombardi
Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Área de concentração em Proteção Florestal. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Engenharia Florestal – dissertação. 2. Eucalipto. 3. Adubação. 4. Bactéria produtora de crescimento. I. Garcia, Flávio Augusto de Oliveira. II. Lombardi, Kátia Cylene. III. UNICENTRO. IV. Título.

CDD 583.42

UNICENTRO
PARANÁ

Universidade Estadual do Centro-Oeste

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

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

PARECER

Defesa Nº 91

A Banca Examinadora instituída pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Florestais, do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Campus de Irati, após arguir a mestranda **Giovanna Marcolin** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "***PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MUDAS DE Eucalyptus benthamii POR BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS***", é de parecer favorável à APROVAÇÃO da estudante, habilitando-a ao título de **Mestre em Ciências Florestais**, Área de Concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais.

Irati-PR, 15 de abril de 2016.

Dr. Paulo Afonso Ferreira
Universidade Federal de Mato Grosso
Primeiro Examinador

Dra. Graziela Piveta
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Segunda Examinadora

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

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

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

À minha nona, Idalina Marcolin (*in memorian*),
que me ensinou coisas que não escrevem nos livros.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

A Capes, pela concessão da bolsa.

Aos funcionários da Unicentro, Odiméia e Ariel, que disponibilizaram tempo e materiais para realização do experimento.

Aos meus colegas de mestrado e da graduação, pela amizade e momentos de descontração, especialmente a Raíssa, que sempre esteve comigo.

Aos colegas e amigos do laboratório de Patologia Florestal, especialmente ao Alexandre, Ana, Fer Rocha, Fer Bortolanza, estagiários e todos que fazem do nosso laboratório, um dos lugares em que mais amei estar.

À minha coorientadora Kátia, pela amizade, pela compreensão, pela disponibilidade, por todo o auxílio dado e por ter despertado em mim, a ideia e o desejo de estudar mais a área de solos.

Ao professor Flávio, que me orienta desde a graduação e que sempre esteve disponível como professor, como orientador, como amigo e em alguns momentos como pai. Aquele que compartilha o conhecimento, as experiências, que ensina mais do que a disciplina patologia florestal, ensina a amar a patologia florestal, és e sempre serás pra mim, um exemplo de pessoa, uma inspiração como professor e orientador.

Aos meus avós Tereza e João, que sempre foram muito carinhosos e me ajudaram em tudo que puderam.

Às minhas tias, Zélia e Sueli, pelos conselhos, pela preocupação e por tudo que sempre fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Luana e João, que me ensinaram que é possível amar incondicionalmente alguém completamente diferente de você.

Aos meus pais, Sidnei e Rosimery, não cabem palavras para agradecer por tudo.

E ao meu filho Alexandre, que só com seu sorriso, consegue alegrar meu dia.

A todos e todas que de alguma forma me ajudaram e torceram por mim.

SUMÁRIO

Lista de figuras vii

Lista de tabelas viii

RESUMO ix

ABSTRACT x

1.1 - INTRODUÇÃO GERAL 1

1.2 - REVISÃO DE LITERATURA 2

1.2.1 - *Eucalyptus* spp. 2

1.2.2 - Fertilidade e Nutrição Mineral do Eucalipto 3

1.2.3 - Importância do Fósforo (P) 5

1.2.4 - Solubilização de fosfatos por microrganismos 6

1.3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 9

2. – CAPÍTULO 1 - Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro* da rizosfera e do filoplano de plantas de *Eucalyptus benthamii*. 16

RESUMO 16

ABSTRACT 17

2.1 - INTRODUÇÃO 18

2.2 – MATERIAL E MÉTODOS 19

2.2.1 - Locais de coleta de solo rizosférico e folhas de eucalipto 19

2.2.1.1 – Local de coleta A 19

2.2.1.2 – Local de coleta B 19

2.2.2 – Realização dos testes *in vitro* 19

2.2.3 - Isolamento das Rizobactérias e Bactérias residentes do filoplano 19

2.2.4 - Teste de Solubilização de Fosfato de Cálcio *in vitro*. 20

2.2.5 - Teste de crescimento e alteração do pH em meio líquido contendo adubos fosfatados 21

2.2.6 – Teste de colonização radicular 21

2.2.7 – Análise estatística 22

2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 22

2.3.1 - Isolamento das Rizobactérias e Bactérias residentes do filoplano 22

2.3.2 - Teste de Solubilização de Fosfato de Cálcio *in vitro* 22

2.3.3 - Teste de crescimento e alteração do pH em meio líquido contendo adubos fosfatados 24

2.3.4 - |Teste de colonização radicular 30

2.4 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES 31

2.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

3 – CAPÍTULO 2 - Promoção de crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* por bactérias solubilizadoras de fosfato sob diferentes doses e fontes de P. 36

RESUMO 36

ABSTRACT 37

3.1 - INTRODUÇÃO 38

3.3 – MATERIAL E MÉTODOS 39

3.3.1 – Realização dos testes 39

3.3.2 – Promoção de crescimento de mudas de *E. benthamii* 39

3.3.3 – Análise estatística 41

3.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

3.4.1 – Emergência de plântulas 42

3.4.2 – Avaliação aos 45 DAS 43

3.4.3 – Avaliação aos 90 DAS 44

3.5 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES 49

3.6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

Lista de figuras

Figura 1. Relação diâmetro do halo formado/diâmetro da colônia bacteriana (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. 23

Figura 2. Halo translucido no entorno da colônia do isolado RB023 de rizobactéria em meio GL acrescido de $CaHPO_4$, após dez dias de incubação. Seta vermelha indica a colônia bacteriana e seta preta indica o halo translucido de consumo da fonte de P. 24

Figura 3. Médias do crescimento das bactérias em meio de cultura GL sem adubo e contendo Superfosfato simples e Fosfato monoamônico dado pela absorbância avaliada em D.O. 600nm. .....27]

Figura 4. Médias de alteração dos valores de pH em relação ao pH inicial (6,5) por bactérias em meio de cultura GL sem adubo, e meio contendo Superfosfato simples e Fosfato monoamônico. 30

Figura 5. Emergência de plântulas de *E. benthamii*, aos 15 DAS. Sendo 023, 030, 041 os isolados bacterianos, T a testemunha (sem bactéria), MAP e SS, fosfato monoamônico e superfosfato simples respectivamente, e 0%, 50% e 100% as doses de P aplicado. 43

Lista de tabelas

Tabela 1. Análise variância para o crescimento das bactérias medidos em D.O. 600nm de absorbância em meio de cultura contendo adubos fosfatados. 25

Tabela 2. Médias de interação para o crescimento das bactérias em meio contendo adubos fosfatados. 26

Tabela 3. Análise de variância para alteração do pH em relação ao pH inicial 6,5, por bactérias cultivadas em meio contendo adubos fosfatados. 28

Tabela 4. Médias de interação para alteração do pH em relação ao pH inicial 6,5, por bactérias cultivados em meio contendo adubos fosfatados. 29

Tabela 5. Análise de variância para diâmetro e altura aos 45 DAS em casa de vegetação. 43

Tabela 6. Médias de interação F1xF2 (bactéria e fonte de P), para altura aos 45 DAS. 44

Tabela 7. Análise variância aos 90 DAS, para diâmetro (mm), altura (mm), comprimento de raiz (mm), peso verde da parte aérea, da raiz e total (mg) e peso seco da parte aérea, raiz e total (mg). 44

Tabela 8. Médias do fator 1, bactéria, para o diâmetro, altura, peso verde da parte aérea, raiz e total, peso seco da parte aérea, raiz e total, aos 90 DAS. 45

Tabela 9. Médias do fator 2, fonte de P, para diâmetro, peso seco da parte aérea e peso seco total, aos 90 DAS. 47

Tabela 10. Médias do fator 3, dose de P, para diâmetro, comprimento de raiz, peso verde da parte aérea, peso seco da parte aérea e total, aos 90 DAS. 47

Tabela 11. Médias de interação F1xF2xF3, para peso seco total aos 90 DAS. 48

Tabela 12. Médias de interação F1xF2xF3 para peso verde de raiz aos 90 DAS 49

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi promover o crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*, através da inoculação nas sementes e no substrato, de isolados bacterianos pré-selecionados, utilizando duas fontes de P e três doses do nutriente. Para tanto, foram isoladas 300 bactérias da rizosfera e do filoplano de plantas de *E. benthamii*. Destes, apenas três isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*: RB023, RB030 e RB041, sendo a primeira mais eficiente do que as demais. Os três isolados foram capazes de crescer no meio liquido contendo adubos fosfatados e também alteram o pH do meio, tornando-o mais ácido. Os três isolados foram selecionados para realização de teste *in vivo*. O experimento foi montado em DIC, em arranjo fatorial triplo, sendo fator 1, as bactérias (três isolados e uma testemunha, sem bactéria), fator 2, a fonte de P (Fosfato monoamônico e Superfosfato simples) e fator 3, a dose de P recomendada (0%, 50% e 100%). Houve efeito significativo, para os três fatores, e interação F1xF2xF3. A bactéria RB030 diferiu da testemunha em todas variáveis avaliadas, exceto comprimento de raiz. O superfosfato simples aumentou as médias de crescimento das mudas e diferiu do fosfato monoamônico para o diâmetro, peso seco da parte aérea e total. A dose que continha zero P, apresentou melhores médias para diâmetro, peso verde da parte aérea, peso seco da parte aérea e total. Em média as mudas inoculadas com os isolados apresentaram 23% mais peso seco total do que as mudas não inoculadas.

Palavras chave: Bactérias promotoras de crescimento de plantas, adubação, eucalipto.

ABSTRACT

The aim of this research was promote the growth of *E. benthamii* seedlings with inoculation on seeds and substrate of selected bacterial isolates, from two phosphorus sources and three dosages of this nutrient. For that, 300 *E. benthamii* rhizosphere and phyloplan bacteria were isolated, of these only three were able to solubilize calcium phosphate *in vitro*: RB023, RB030 and RB041, being the first isolate most efficient than others. The three isolates were able to grown in liquid medium containing phosphate fertilizers and changed the medium pH, making the medium acid. RB023 and RB030 are considered PGPR's, because they were able to colonize the roots of the *E. benthamii* seedlings. The three isolates were selected to perform *in vivo* tests. The assay was established in a completely randomized design (CRD), in a threefold factorial arrangement, that factor 1 (F1) are the bacteria (three isolates and one control, without bacteria), factor 2 (F2) the phosphorus source (monoammonium phosphate and simple superphosphate) and factor 3 (F3) the recommended phosphorus dosage (0%, 50% and 100%). There was significant effect for three factors and interaction F1xF2xF3. The bacteria RB030 differed from the control in all variables evaluated, except in the root length. The simple superphosphate increased the seedlings growth average and differed from the monoammonium phosphate in diameter, aboveground biomass and total biomass. The dosage without phosphorus presented better diameter average, fresh aboveground weight, aboveground biomass and total biomass. On the average the inoculated seedlings presented 23% higher total biomass than the non-inoculated seedlings.

Keywords: Phosphate solubilizing bacteria, fertilizing, eucalypt.

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro expandiu consideravelmente a área plantada nos últimos anos e, atingiu 7,74 milhões de hectares em 2014, cerca de 72% desta área, são de espécies de *Eucalyptus* (IBÁ, 2015). Apesar de não deter a maior área florestal plantada do mundo, ficando atrás de China, Índia e Estados Unidos, o país contribui com 17% de toda a madeira colhida anualmente no planeta, devido à alta produtividade dos plantios (IBÁ, 2014).

Juntas, as regiões sul e sudeste do Brasil formam o maior polo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais. Porém, as espécies do gênero *Eucalyptus* adaptadas às condições climáticas da região sul, constituem um grupo muito restrito (BRONDANI, 2008). *Eucalyptus benthamii* é uma espécie que possui níveis de resistência à geada, sendo adequada para plantio nesta região (PALUDZYSZYN FILHO *et al*., 2006).

Assim como todos os vegetais, as árvores de eucalipto absorvem uma quantidade considerável de nutrientes do solo, os quais são vitais para o desenvolvimento dos plantios (MORA, GARCIA; 2000).

Os elementos minerais essenciais são divididos em macro e micronutrientes de acordo com a necessidade das plantas. O nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são utilizados em maior proporção, quando realizada a adubação, sendo considerados macronutrientes (MALAVOLTA, 1989). Embora o P não seja o nutriente mineral exigido em maior quantidade pelas plantas, relata-se que sua ausência ou concentrações deficitárias implica em perdas na produção de biomassa vegetal (MALAVOLTA, 1980; TAIZ, ZEIGER, 2004).

O P é essencial para a síntese de ácidos nucléicos por meio do fosfato orgânicos presente nos nucleotídeos, na forma de fosfolipídios, importante componente da membrana celular e na produção de energia por meio da Adenosina Trifosfato (ATP) (MALAVOLTA, 1980). Sem P não há metabolismo, por não haver transferência de energia. Essa é a razão por que o efeito do P, nos solos brasileiros, é tão pronunciado (PRIMAVEZI, 2002).

Além disso, a adubação fosfatada é de baixa eficiência, cerca de apenas 20% do fosforo aplicado no solo é aproveitado pela planta no primeiro ano, aliado ao seu alto poder de adsorção fazem com que os adubos fosfatados sejam os mais consumidos do país (MALAVOLTA, 1980).

Os microrganismos podem melhorar a eficiência de adubação, visto que são os principais catalisadores de nutrientes do solo (MADIGAN *et al*., 2010) e as rizobactérias, bactérias que vivem na região que sofre influência do sistema radicular, são capazes de solubilizar P, entre outros inúmeros benefícios e torna-lo disponível as plantas (ROMEIRO, 2007), assim como, bactérias residentes do filoplano, que podem também exercer sobre as plantas efeitos benéficos (VIEIRA JÚNIOR *et al*., 2009). Sendo assim, bactérias solubilizadoras de fosfato seriam uma alternativa para aumentar o aproveitamento dos adubos fosfatados, e promover o crescimento de mudas.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. *Eucalyptus* spp.

Desde a descoberta da Austrália, as espécies de *Eucalyptus* espalharam-se pelo mundo e hoje são plantadas comercialmente em diversos países (FONSECA *et al.*, 2010). No Brasil o cultivo com fins comerciais, iniciou-se pelo engenheiro Edmundo Navarro de Andrade, que buscou plantar espécies florestais a fim de verificar aquelas com potencial econômico. Devido à demanda constante da companhia de estrada de ferro, a qual Navarro de Andrade trabalhava, por madeira para produção de energia renovável, combustível, estacas, toras, postes e dormentes, buscou-se no eucalipto a solução para o suprimento de madeira em menor tempo de cultivo (ANDRADE, 1961).

A versatilidade da madeira e o rápido crescimento fazem com que atualmente *Eucalyptus* spp. sejam as espécies arbóreas mais plantadas no mundo. Dos pouco mais de 7,7 milhões de hectares de florestas plantadas no Brasil, 72% são de eucalipto (IBÁ, 2015).

À alta produtividade dos plantios brasileiros, faz com que o país contribua com 17% de toda madeira colhida anualmente no mundo, em termos de área plantada, perde apenas para China, Índia e Estados Unidos (IBÁ, 2014).

As árvores que popularmente são conhecidas como eucalipto, pertencem à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales, família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus*. Desse gênero são conhecidas mais de 600 espécies, quase todas nativas da Austrália e de países próximos (FONSECA *et al.*, 2010).

No cenário Brasileiro *E. grandis* e *E. urophylla* assumiram importante papel, devido ao sucesso dado pela hibridação das duas espécies que aliou o crescimento em altura de uma espécie com o diâmetro de outra (BRIGATTI *et al.*, 1980). Híbridos baseados nestas duas espécies dominam as áreas de eucaliptocultura brasileira, sendo inclusive recomendada para algumas regiões do sul brasileiro (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). Contudo, devido a fatores climáticos em que a frequente ocorrência de geadas no inverno é o principal, reveste de limitações para o cultivo dos híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* nestas localidades.

As espécies de *Eucalyptus* economicamente importantes para estas situações constituem um pequeno número, entre elas, as espécies de *E. dunni*, *E. benthamii*, *E. Saligna*, e *E. grandis* (PALUDZYSZYN FILHO *et al*., 2006), sendo *E. benthamii* a espécie mais resistente a geadas, frequentes na região (BRONDANI, 2008). No que se propõem aliar a resistência à geadas de uma espécie com a característica de crescimento de outra, ressalta-se que ainda são poucos os estudos no tocante ao melhoramento de espécies como *E. dunnii*, *E. benthamii*, o que afeta a expansão do plantio destas espécies puras ou hibridizadas.

E. benthamii tem seu centro de diversidade em solos férteis das partes planas de deposição de rios na Austrália, em uma área de 100 km de comprimento por 40 km de largura, sendo uma espécie de distribuição territorial limitada (FONSECA *et al.*, 2010).

Resistente ao frio, suporta temperaturas mínimas absolutas de até -10ºC, suportando em média 25 geadas anuais (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). É indicado principalmente para produção de biomassa, não sendo muito adequado para serraria, sobretudo, ainda precisa ser incluído em programas de melhoramento genético para que possa ser utilizado para outros fins (GRAÇA *et al.*, 1999; BRONDANI, 2008).

1.1.2. Fertilidade e Nutrição Mineral do Eucalipto

A literatura relata que da matéria seca das plantas, 95% é composto por C, H e O, ressaltando-se que estes elementos não são obtidos, via de regra do solo. Os 5% restantes, são compostos pelos elementos minerais essências, os quais, se ausentes, impedem o completo desenvolvimento da planta. Estes elementos ainda são divididos em macro e micronutrientes, conforme a quantidade que a planta necessita (MALAVOLTA, 1976; MALAVOLTA, 1980; MALAVOLTA, 1989; MALAVOLTA *et al.*, 1997; MALAVOLTA, 2006).

Muitas vezes o solo não possui a concentração ou a disponibilidade nos níveis essenciais dos elementos para que possam garantir a produtividade desejada do cultivo florestal, sendo assim necessário o "*input*" de fontes exógenas destes elementos os quais denomina-se fertilizantes. Fertilizantes são empregados para suprir as necessidades nutricionais das plantas, quando o solo por si só não tem condições de fazê-lo (RODELLA, ALCARDE; 2005).

Normalmente acredita-se que os eucaliptos são árvores de rápido crescimento, implicando em rápido retorno ao agricultor. Porém, isto é parcialmente verdadeiro pois se não for observado fatores, em que a qualidade do material genético e as condições de solo a resposta pode ser diretamente proporcional (BELLOTE, SILVA; 2005). Os locais em que as espécies do gênero, são frequentemente plantadas, geralmente são locais de baixa fertilidade natural de solos, sendo sempre necessária a adição de fertilizantes.

Em plantios de eucalipto são empregadas concentrações mais elevadas em P, como 6-30-6 e 8-28-6 compostas em geral por fosfato diamônico (DAP), superfosfato triplo, uréia, e cloreto de potássio (KCl), já na adubação de cobertura são empregadas 20-0-20 e 20-5-20 (RODELLA, ALCARDE; 2005). Segundo Gonçalves *et al.* (2000), tem se recomendado que 20 a 40% das doses de N e K_2O e, 100% da dose de P_2O_5, sejam aplicadas na ocasião do plantio. Alternativamente, para evitar que o P seja imobilizado no solo, em maiores quantidades, principalmente nos solos mais argilosos, é interessante parcelar, também, as aplicações de P, como recomendado para nitrogênio e potássio.

Rodella, Alcarde (2005) citam que em plantios florestais, sintomas mais comuns de deficiência são de K_2O, boro (B) e P_2O_5. O B é um micronutriente de extrema importância para eucalipto, principalmente em regiões onde é maior a frequência de deficiência hídrica (GONÇALVES, BENEDETTI; 2005), em relação as suas funções na planta, está envolvido no alongamento celular e no metabolismo dos ácidos nucléicos (TAIZ, ZEIGER; 2004). Em relação a calagem, Neves *et al.* (1990) citam que as espécies de *Eucalyptus* parecem ter níveis de resistência a acidez do solo e a concentrações elevadas de alumínio (Al), manganês (Mn) e ferro (Fe). No entanto, as espécies respondem positivamente à calagem, mas isso se deve principalmente a elevação dos teores de cálcio e/ou magnésio do que a correção do pH propriamente dito.

Após o fechamento das copas, a ciclagem de nutrientes já está estabelecida e é pouco provável que haja resposta a fertilização. Para eucalipto o pico de absorção de N e P_2O_5 ocorrem entre o segundo e o quarto ano pós plantio, dependendo de outras variáveis (GONÇALVES *et al.*, 2000).

Quanto a *E. benthamii*, Serpe (2015) relata que obteve melhores resultados quando adotou a adubação de base (28,8 kg.ha^{-1} de P_2O_5, 30,4 kg.ha^{-1} de cálcio (Ca) e 17,6 kg.ha^{-1} de enxofre (S)) e as adubações de cobertura aos 30 dias (14,4 kg.ha^{-1} de N, 72 kg.ha^{-1} de P_2O_5, 14,4 kg.ha^{-1} de K_2O, 0,12 kg.ha^{-1} de B e 0,48 kg.ha^{-1} de zinco (Zn)) e aos 60 e 90 dias (2 aplicações de 36 kg.ha^{-1} de N, 12 kg.ha^{-1} de P_2O_5, 72 kg.ha^{-1} de K_2O, 0,48 kg.ha^{-1} de B e 0,05 kg.ha^{-1} de Zn). Essas adubações proporcionaram maior crescimento em volume médio individual, volume total, volume comercial e Incremento Médio Anual - IMA volumétrico. Além disso a receita bruta do tratamento que recebeu adubação quando comparado à testemunha foi superior em R$ 4.769,00 por hectare.

DIAS *et al*. (2015) relatam que plantas de *E. bethamii* respondem pouco a calagem. Contudo, aliada ao fosfato solúvel ou fosfato natural Bayovar, a calagem melhorou o desempenho das mudas e aumentou o teor de P no tecido das plantas de eucalipto no período analisado (110 dias). Já os fosfatos de Gafsa e Djebel apresentam sua eficiência relativa reduzida nos solos com calagem.

1.1.3. Importância do Fósforo (P)

O P_2O_5 é um nutriente mineral essencial, e é um dos elementos que frequentemente limitam a produção de eucalipto nas regiões subtropicais e tropicais, e por essa razão, é o mais fornecido como adubo (MALAVOLTA, 1976). É absorvido pelas plantas sob a forma de ânions $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}, sendo altamente dependente de acidez e umidade do solo (GIRACCA, NUNES; 2015). O P_2O_5 estimula o crescimento e a formação do sistema radicular no início do desenvolvimento da planta (GONÇALVES, BENEDETTI; 2005).

Esse nutriente é essencial para a síntese de ácidos nucleicos, para os fosfolipídios componentes da membrana celular, composto extremamente importante para o armazenamento e a transferência de energia por meio da molécula de adenosina trifosfato - ATP (MALAVOLTA, 1980). Sem P não há metabolismo, por não haver transferência de energia. Essa é a razão por que o efeito do P, nos solos brasileiros, é tão pronunciado (PRIMAVEZI, 2002).

A baixa eficiência da adubação fosfatada, cerca de apenas 20% do P aplicado no solo é aproveitado pela planta no primeiro ano, aliado ao seu alto poder de adsorção, fazem com que os adubos fosfatados sejam os mais consumidos do país (MALAVOLTA, 1980).

Além disso, as jazidas de P já atingiram seu pico de produção em 1989, o que significa que futuramente, a demanda pelo elemento será maior do que a oferta, o que provavelmente provocará elevação dos custos, e consequentemente, uma busca por maior eficiência na adubação (WEID, 2009).

Fato comprovado é que os preços dos adubos fosfatados subiram muito nos últimos 20 anos, principalmente do superfosfato triplo, que é um dos mais utilizados na produção de eucalipto. Em 1995, o custo era de R$ 120/t, em outubro de 2014 o preço atingiu R$ 1004/t e em outubro de 2015 com intervalo de apenas um ano o preço atingiu valores de R$ 1467/t, chegando a picos de R$ 2000/t na crise de 2008 (INDEXMUNDI, 2015).

Segundo (MALAVOLTA, 1980), não é fantasia pensar que no futuro, os limites da população mundial serão ditados pelo esgotamento das jazidas de P. A explicação para essa afirmativa é: nenhum outro elemento pode substituir as funções que o P exerce na vida da planta e sem adubação fosfatada, não há produção de alimentos e fibras.

1.1.4. Solubilização de fosfatos por microrganismos

Apesar de seu tamanho diminuto, os microrganismos representam metade de toda a biomassa da Terra. Nenhum habitat terrestre sustenta a vida de organismos superiores sem a presença dos microrganismos (MADIGAN *et al.*, 2010). Eles representam 60% a 80% da fração viva e mais ativa da matéria orgânica do solo (MENDES, REIS JÚNIOR; 2003).

Diversos fatores, externos e internos, afetam a absorção de nutrientes, como por exemplo a sua disponibilidade, aeração, temperatura, pH, presença ou ausência de outros íons, genética, intensidade de transpiração, entres outros. Dentre esses fatores, se encontram os microrganismos não infectantes, que podem aumentar a disponibilidade, concentração e absorção dos nutrientes (MALAVOLTA *et al.*, 1997). Os microrganismos são os principais catalisadores de nutrientes, também são os principais responsáveis pela conversão desses elementos em formas que podem ser utilizadas pelas plantas (MADIGAN *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2005). A maioria da vegetação no mundo parece ter raízes associadas a

fungos micorrízicos, sendo que 83% das dicotiledôneas, 79% das monocotiledôneas e todas as gimnospermas formam associações micorrízicas regularmente (TAIZ, ZEIGER; 2004).

A disponibilidade de P, depende de sua solubilidade que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e dos microrganismos do solo, além de o P imobilizado na biomassa microbiana constituir-se num reservatório lábil desse nutriente. Os microrganismos do solo também desempenham papel fundamental nos processos de mineralização e solubilização desse elemento (MENDES, REIS JÚNIOR, 2003). A maior atividade microbiana ocorre nas camadas superficiais ricas em matéria orgânica, especialmente no interior e ao redor da rizosfera (MADIGAN *et al*., 2010).

Segundo Malavolta *et al.* (1997), até 30% do carbono fixado na fotossíntese pode ser liberado na rizosfera na forma de restos de lizados celulares, mucilagens e compostos de baixo peso molecular como açucares, ácidos orgânicos, aminoácidos e fenóis, podendo ter importância indireta na nutrição de plantas por servir como alimento para os microrganismos. Os exsudados radiculares tornam a rizosfera uma região densamente povoada, quando comparada ao solo não rizosférico (MALAVOLTA *et al.*, 1997; PRIMAVEZI, 2002; ROMEIRO, 2007a). Segundo Troeh & Thompson (2007), essas substancias exsudadas, nutrem os microrganismos do solo e aumentam a atividade destes de 100 a 1000 vezes comparados aos que residem fora da rizosfera, essa atividade microbiana concentrada contribui para liberação de nutrientes do solo. Da complexa comunidade biológica existente no solo, os procariotas constituem a maior parte em número e em diversidade (ROMEIRO, 2007a).

As rizobactérias (bactérias presentes na rizosfera) podem ser benéficas, neutras ou deletérias. As colonizadoras de raízes, que exercem sobre as plantas efeitos benéficos sobre o seu desenvolvimento, através de mecanismos diretos ou indiretos, foram definidas como PGPR -Plant Growth Promoting Rhizobacteria (ROMEIRO, 2007a; ALFENAS *et al.*, 2009) O sistema radicular começa a ser colonizado pela bactéria desde o momento da sua germinação (FERRAZ *et al.*, 2008) e as PGPR podem induzir em plantas, resistência sistêmica a vários patógenos ou atuarem diretamente sobre esses, como demonstrado contra várias espécies de fungos, bactérias e vírus (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Os benefícios conhecidos são diversos, entre eles, a produção de fitormônios, como auxinas, inibição da

síntese de etileno, mineralização de nutrientes, produção de antibióticos e também o biocontrole (ERTURK *et al.*, 2010).

Tem-se postulado que rizobactérias possam ser organismos que auxiliem de forma benéfica a produção de mudas florestais (SILVA *et al*., 2003; ROMEIRO, 2007a; MAFIA *et al*., 2009). Na área florestal, o uso de rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas é fato ainda novo, sobretudo em relação à propagação seminal de mudas (ENEBACK *et al*., 1998).

Bactérias residentes do filoplano, podem também exercer sobre as plantas efeitos benéficos (VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2009). O filoplano é a superfície da parte aérea dos vegetais que abriga uma microbiota diversificada, a exemplo de fungos, leveduras, protozoários entre outros, sendo as bactérias as de maior abundância (ROMEIRO, 2007a). As bactérias do filoplano provavelmente são procedentes de outras partes da planta, como frutos, flores e principalmente as raízes, portanto seus benefícios são comparáveis aos das rizobactérias (WINDELS, LINDOW, 1985; MARTINS *et al*., 2013).

Quanto a solubilização de fosfatos, Sylvester-Bradley *et al.* (1982) quantificaram microrganismos solubilizadores de fosfatos em forrageiras e leguminosas da Amazônia, e verificaram que os fungos estavam presentes em quantidades muito pequenas, sendo que o número total de microrganismos que solubilizaram fosfatos em gramíneas foi maior naquelas não adubadas e o contrário para as leguminosas, indicando que devem haver diferenças nos exsudados orgânicos das raízes e na interação com os adubos conforme a espécie a ser estudada.

Silva Filho, Vidor (2000) testaram diferentes fontes de carbono em meio de cultura, para verificarem se haviam diferenças na solubilização de fosfatos por microrganismos com a mudança da fonte de carbono utilizada. Foi observado que houve maiores crescimentos dos solubilizadores de fosfatos na presença de xilose, frutose, glicose e sacarose.

Souchie *et al.* (2007) utilizando plantas de feijão guandu como isca, e por meio de testes de laboratório, encontraram 12 fungos e 37 bactérias capazes de solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido. Todos os isolados foram submetidos ao teste de solubilização de fosfatos em meio líquido e 11 dos 12 isolados de fungos e nove das 37 bactérias, aumentaram o teor de P solúvel no meio, como também modificaram o seu pH.

Barroso, Nahas (2008) avaliaram a solubilização de fosfato de ferro *in vitro* pelo fungo *Aspergillus Níger.* A máxima solubilização ocorreu no 11º dia de incubação, chegando a 70% do fosfato, e a produção de ácidos foi o principal mecanismo de solubilização.

Chagas Júnior *et al*. (2010) verificaram que isolados de rizóbios de solos da Amazônia solubilizaram fosfatos *in vitro*, sendo que oito de 14 isolados pré-selecionados, aumentaram o teor de P na parte aérea das plantas.

Silva *et al.* (2011) avaliando a ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio e alumínio *in vitro*, em espécies de importância econômica em cinco localidades diferentes no estado do Amazonas, verificaram uma grande variação da percentagem de isolados solubilizadores de fosfatos. Além disso, observaram variação entre as localidades estudadas, em que na terceira localidade não houve bactérias positivas, ou seja, que solubilizam fosfato, enquanto que nas demais foram encontradas bactérias positivas, com valores variando de 1% de positivas em plantas de caju na localidade três, e 32% em plantas de café na primeira localidade.

Quanto a solubilização de fosfatos por microrganismos especificamente para espécies de *Eucalyptus*, Silva Filho *et al.* (2002) verificando a capacidade de bactérias em solubilizar fosfatos no meio GES (Composto principalmente de glicose (G) e extrato de solo (ES)), de isolados oriundos de plantios de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., obtiveram 31 de 56 isolados positivos.

Souza *et al*., (2004) avaliaram a eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de P e na promoção de crescimento de mudas. Dois isolados possibilitaram uma maior absorção de P pelas mudas, sendo que o aumento das doses de P inibiu a colonização radicular dos isolados.

1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ANDRADE, E. N. **O eucalipto**. 2 ed. Jundiaí, São Paulo, 1961.

BARROSO, S. B.; NAHAS, E. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 43, n. 4, p.529-535, 2008.

BELLOTE, A. F. J.; SILVA, H. D. da. Técnicas de amostragem e avaliações nutricionais em plantações de *Eucalyptus* spp. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. (ed) **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005.

BRIGATTI, R.A.M.; SILVA, A.P.; FEITAS, M. Estudo comparativo do comportamento de alguns híbridos de *Eucalyptus* spp. **Circular Técnica,** Piracicaba, n.123. 1980.

BRONDANI, G. E.; **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de, OLIVEIRA, A. N. de, WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy.** Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

DIAS, L. P. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; SIMONETE, M. A.; BICARATTO, B. Eficiência relativa de fosfatos naturais na adubação de plantio de mudas de *Eucalyptus dunnii* maiden e *Eucalyptus benthamii* maiden et cambage em solo sem e com calagem. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 37-48, 2015.

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

ERTURK, Y., ERCISLI, S., HAZNEDAR, A., CAKMAKCI, R., Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. **Biol. Res.**, Santiago, v. 43, n. 1, 2010 .

FERRAZ, H. G. M., ROMEIRO, R. da S., GARCIA, F. A. de O., SOUZA, A. N. de, Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em função do modo de dispensa na planta. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. Chapadinha, v. 2, n. 2, p. 35, 2008.

FONSECA, S. M. da, RESENDE, M. D. V. de, ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. da S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto.** Viçosa: Editora UFV, 2010. 200p.

GIRACCA, E. M. N.; NUNES, J. L. da S. **Fósforo (P)**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_fosforo.aspx> Acesso em 5 dez. 2015.

GONÇALVES, J. L. de M; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. 427p.

GONÇALVES, J. L. de M.; STAPE, J. L.; BENEDETTI, V.; FESSEL, V. A. G.; GAVA, J. L. Reflexos do cultivo mínimo e intensivo do solo em sua fertilidades e na nutrição das árvores. In: GONÇALVES, J. L. de M; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p.3-57.

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

IBÁ, **Anuário estatístico IBÁ 2015**: ano base 2014. Brasília: IBÁ, 2015. 64p.

IBÁ, **Anuário estatístico IBÁ 2014**: ano base 2013. Brasília: IBÁ, 2014. 100p.

INDEXMUNDI, **Fertilizante – Superfosfato Triplo**. Disponível em: <http://www.indexmundi.com/pt/pre%E7os-de-mercado/?mercadoria=superfosfato-triplo&meses=240&moeda=brl>, acesso em 07 dez. 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Tradução: MARANHÃO, A. Q.; LIMA, B. D. de, KYAW, C. M. Porto Alegre: Artmed, 2010. Tradução de Brock: biology of microorganisms. 1160p.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B. & SIQUEIRA, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento de clones de eucalipto. **Revista Árvore**. v.33, p.789-797, 2009.

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1976. 528p.

MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. 5ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1989. 292p.

MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; VITI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997, 319p.

MALAVOLTA, E., **Manual de Nutrição Mineral de Plantas.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2006. 638p.

MARTINS, G.; LAUGA, B.; MIOT-SERTIER, C.; MERCIER, A.; LONVAUD, A.; SOULAS, M. L.; SOULAS, G.; MASNEUF-POMARE, I. Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. **PLOS ONE**. v.8, n. 8, p. 1-9, 2013.

MENDES, I. de C.; REIS JR., F. B. dos. **Microrganismos e disponibilidade de (P) nos solos**: uma análise crítica. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 26p. (Documentos, 85).

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112p.

NEVES, J. C. L.; GOMES, J. M.; NOVAIS, R. F. Fertilização mineral de mudas de eucalipto. In: BARROS, N. F. de, NOVAIS, R. F. de. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa: Editora folha de Viçosa, 1990. 330p.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PRIMAVESI, A., **Manejo ecológico do solo:** agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Editora Nobel, 2002.

RODELLA, A. A.; ALCARDE, J. C. Requisitos de qualidade física e química de fertilizantes minerais. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. (ed) **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças em plantas: Fudamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 269p. a.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças em plantas: Procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 172p. b.

SERPE, E. L. **Efeitos de diferentes dosagens de adubação no crescimento inicial de *Eucalyptus benthamii* na região sul do estado do Paraná**. 2015. 100f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, 2015.

SILVA, A. C. S. da; CHAGAS JR., A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância

econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.2, n.1, p. 37-42, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 24, p. 311-319, 2000.

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

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 40, n. 11, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, L. A. B. de, SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. de. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, n.4, p.349-355, 2004.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras da Amazônia. **Acta Amazônica**. Manaus, v.12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Tradução: SANTARÉM, E. R.; MARIATH, J. E. de A.; ASTARITA, L. V.; DILLENBURG, L. R.; ROSA, L. M. G.; OLIVEIRA, P. L. de. Porto Alegre: Artmed, 2004. Tradução de Plant Physiology. 719p.

TEIXEIRA, D.A., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A. & FERREIRA, E.M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 350-356, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TROEH, R. F.; THOMPSON, L. M. **Solos e fertilidade do solo**. São Paulo: Andrei, 2007. 718p.

VIEIRA JR, J. R.; FERNANDES, C. de F.; MARCOLAN, A. L.; SILVA, D. S. G. da; ANTUNES JR, H.; REIS, N. D.; **Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 20p. (Documentos, 132).

WEID, J.M.V.D. Um novo lugar para a agricultura. In: PETERSEN, P. (org.) **Agricultura familiar camponesa na construção do futuro**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2009. p.47-65.

WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. Madison: The American Phytopathological Society, 1985. 169p.

2. CAPÍTULO - 1

Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro* isoladas da rizosfera e do filoplano de plantas de *Eucalyptus benthamii*.

RESUMO

Giovanna Marcolin. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro* isoladas da rizosfera e do filoplano de plantas de *Eucalyptus benthamii*.

As plantas necessitam de nutrientes para se desenvolver completamente, e o P (P) é o nutriente mais fornecido como adubo e é o elemento que mais frequentemente limita a produção. Pouco do P aplicado no solo é realmente aproveitado pelas plantas, e as perdas são pequenas, a maior parte do nutriente é adsorvido ao solo. Como os microrganismos são os principais catalisadores de nutrientes e podem entre outras coisas, solubilizar o P e torna-lo disponível as plantas, selecionar bactérias para promover o crescimento de mudas, com base em sua capacidade de solubilizar P, pode ser uma alternativa, principalmente pela importância do elemento, e pela diminuição do crescimento que a falta do mesmo causa. Assim, objetivou-se selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato, que possam posteriormente promover o crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*. Foram isoladas 300 bactérias, dessas somente três foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, as bactérias RB023, RB030 e RB041, sendo a primeira mais eficiente na solubilização. As três bactérias foram capazes de crescer no meio de cultura sem adubos, e nos meios contendo superfosfato simples e fosfato monoamônico, bem como foram capazes de alterar o pH inicial dos meios.

Palavras chave: nutrição mineral, fósforo, promoção de crescimento.

ABSTRACT

Giovanna Marcolin. *In vitro* selection of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere and phyloplan of *Eucalyptus benthamii* seedlings.

Plants need nutrients to growth completely and phosphorus is the most nutrient added as a fertilizer and the element that frequently most limits the production. Of phosphorus applied just a few part is really utilized for the plants and the losses are low as the most part is fixed in the soil. As the microorganisms are the main catalyzers of nutrients and are able, among other things, to solubilize phosphorus and make it available to the plants, selecting bacteria to promote seedlings growth, based on its capacity to solubilize phosphorus, can be an alternative, mainly cause of the importance of this element and the growth decrease that its shortage can cause. The aim of this research was select phosphorus solubilizing bacteria, that can then promote the growth of *E. benthamii* seedlings. For this 300 bacteria were isolated, of them only three were able to solubilize calcium phosphate *in vitro*, that are RB023, RB030 e RB041, being the first more efficient to solubilize. The three bacteria were able to grow in the culture medium without fertilizers and in mediums containing simple superphosphate and monoammonium phosphate, as well as they were able to change the initial medium pH.

Keywords: Phosphate, bacteria, growth promotion.

2.1. INTRODUÇÃO

O crescimento vegetal é dependente de nutrientes minerais, eles constituem cerca de 5% da matéria seca de plantas (MALAVOLTA et al., 1997). Quando o solo por si, não consegue suprir as necessidades nutricionais das plantas, faz-se necessário a adição exógena destes nutrientes pela aplicação de fertilizantes (RODELLA, ALCARDE, 2005).

O fósforo (P ou P2O5) é um macronutriente mineral essencial, que com maior frequência limita a produção vegetal nas regiões subtropicais e tropicais. A adubação fosfatada é de baixa eficiência, cerca de 20% do fosfato aplicado no solo é aproveitado pela planta, pois possui alto poder de adsorção. Esse conjunto de fatores fazem com que os adubos fosfatados sejam os mais consumidos do país e o P seja o nutriente mais fornecido como adubo para as plantas, mesmo não sendo o que elas necessitam em maior quantidade (MALAVOLTA, 1976; MALAVOLTA, 1980).

O preço dos adubos fosfatados, como o superfosfato triplo, aumentou gradativamente nos últimos 20 anos, e esta alta nos preços tende a continuar, uma vez que as fontes de P estão em processo de exaurimento (WEID, 2009).

O P tem função primordial no metabolismo vegetal e, uma possível escassez das fontes deste nutriente podem implicar em redução na produção de biomassa vegetal, seja para alimentação ou para outras finalidades (MALAVOLTA, 1980).

Do P que é aplicado no solo e não é aproveitado pelas plantas, é quase nula a perda por lixiviação, normalmente ocorrendo por erosão. A maior parte do P é fixado no solo, principalmente pelos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e em formas que não são assimiláveis pelas plantas.

Os microrganismos são os principais catalizadores de nutrientes do solo e são capazes de solubilizar P e torna-lo disponível as plantas, por isso, selecionar bactérias com base em sua capacidade de solubilizar esse elemento, pode ser uma alternativa para um melhor aproveitamento do nutriente, principalmente pela importância e pela influência no crescimento que o mesmo exerce sobre as plantas num todo e neste caso sobre o Eucalipto.

2.1.1. OBJETIVOS

2.1.2. Objetivo geral

- Selecionar bactérias da rizosfera e/ou residentes do filoplano de plantas de *Eucalyptus benthamii*, capazes de solubilizar fosfato *in vitro.*

2.1.3. Objetivos específicos

- Isolar bactérias da rizosfera e do filoplano de plantas de *Eucalyptus benthamii;*

- Avaliar as bactérias quanto a sua capacidade de solubilização de fosfato de cálcio *in vitro*;

- Avaliar as bactérias quanto a sua capacidade de crescer e de alterar o pH em meio líquido contendo adubo fosfatado;

- Avaliar as bactérias quanto a sua capacidade de colonizar as raízes de eucalipto *in vitro*;

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Locais de coleta de solo rizosférico e folhas de eucalipto.

2.2.1.1. Local de coleta "A".

A coleta foi realizada em um plantio experimental de *E. benthamii*, localizado no *Campus* Irati da UNICENTRO, localizado na cidade de Irati-PR, com cerca de cinco anos de idade e espaçamento 3x2 e com o preparo de solo, controle de mato competição e adubação realizadas segundo Woiciechowski (2011).

2.2.1.2. Local de coleta "B".

A coleta foi realizada em um plantio experimental de *E. benthamii*, localizado no *Campus* CEDETEG da UNICENTRO, na cidade de Guarapuava-PR. Esse plantio tinha cerca de dez anos, em uma área de 1 ha sendo os tratos culturais realizados segundo Benin (2014).

2.2.2. Realização dos testes *in vitro*.

Os ensaios foram realizados no laboratório de Patologia Florestal e no laboratório de Solos Florestais da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, localizados no *Campus* de Irati-PR.

2.2.3. Isolamento das rizobactérias e bactérias residentes do filoplano.

Nos plantios de *E. benthamii* selecionados, foram coletadas de três árvores distintas, cerca de 100 g de solo rizosférico por planta (num raio de 4 cm de distância do sistema radicular), sendo as amostras homogeneizadas e transformadas em uma única composta. Da mesma forma, foram coletadas folhas de três árvores distintas, cerca de 100 g de folhas por planta, sendo as amostras homogeneizadas e transformadas em uma única composta.

As amostras foram levadas para o laboratório de Patologia Florestal, retirando-se uma alíquota de 10 g e as depositando em frascos Erlenmeyers de 250 mL distintos, contendo solução salina (0,85%) (p/v), previamente esterilizada em autoclave por 20 minutos a 120 °C e 1,0 atm, formando-se uma suspensão de solo ou uma suspensão de folhas de acordo com o material de origem. Os frascos foram postos em agitação a 100 rpm em agitador orbital do tipo incubadora shaker, da marca Ethiktechnology, com temperatura controlada em 28 ºC por 2h.

Posteriormente, procedeu-se em câmara de fluxo laminar, uma diluição seriada 1:10 em que: retirou-se 1 mL da suspensão do frasco de Erlenmeyer com pipeta automática, transferindo-a para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85%) (p/v) esterilizada. O tubo de ensaio foi agitado em vortex e em seguida de maneira análoga, 1 mL dessa primeira diluição foi transferida para o tubo subsequente. O processo foi repetido até o décimo tubo de forma a se ter uma diluição seriada até $1x10^{10}$.

Após, retirou-se uma alíquota de 100 µL de cada tubo, depositando-os em placas de Petri contendo meio *Trypticase Soy Agar* (TSA) esterilizado e, com uma alça de Drigalsky realizou-se o espalhamento da diluição na superfície do meio. As placas foram então incubadas em estufas do tipo B.O.D., por um período de 24 a 48 horas a 28 °C.

Após o período de incubação, as colônias individualizadas, foram repicadas para tubos de ensaio, contendo meio TSA inclinado e esterilizado.

As bactérias receberam um código de identificação composto de duas letras e um número, sendo denominadas “R” as rizobactérias e “F” as residentes do filoplano, seguido da letra “A” ou “B”, indicando o local da coleta, e um número, de três algarismos, iniciando em 001.

2.2.4. Teste de Solubilização de fosfato de cálcio *in vitro.*

Segundo métodologia proposta por Sylvester-Bradley *et al*. (1982), as bactérias foram repicadas em pontos equidistantes de uma placa de Petri contendo meio de cultura GL (10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura, 15 g de Ágar e água destilada q.s.p. 1.000 mL).

A cada 850 mL do meio, acrescentou-se 150 mL de uma solução de $CaHPO_4$, resultante da reação de 50 mL da solução de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 0,57M e de 100 mL da solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,90M. O meio GL e as soluções foram autoclavados separadamente, e somente após a esterilização, é que foram misturadas em meio asséptico, ajustando-se o pH para 7, com auxílio de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

Posteriormente as placas foram incubadas em B.O.D. a 28 ºC, por até 10 dias. As colônias de bactérias que formaram um halo claro no seu entorno, foram consideradas solubilizadoras de fosfato de cálcio, e tiveram o diâmetro da colônia e do halo medidos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Cada isolado bacteriano consistiu em um tratamento distinto, totalizando 300 tratamentos com quatro repetições cada.

2.2.5. Teste de crescimento e alteração do pH em meio líquido contendo adubos fosfatados.

De acordo com o método proposto por Souchie *et al.* (2005) e com adaptações, em 20mL do meio GL líquido foram acrescidos de 1,08 $g.L^{-1}$ de P_2O_5, com pH ajustado para 6,5, e posteriormente inoculados com 100 µL de suspensão da cultura bacteriana, com concentração ajustada para 0,4 em D.O. de 600nm (10^8 $ufc.mL^{-1}$), e incubados a 28 °C, por 7 dias, sob agitação de 125 rpm em agitador orbital. Após a incubação, avaliou-se a alteração do pH e a concentração de células bacterianas em espectrofotômetro (O.D. 600nm). O delineamento utilizado foi o DIC, no esquema fatorial 3X2, sendo isolados bacterianos (RB023, RB030, RB041) e duas fontes de P (fosfato monoamônico e superfosfato simples), cada tratamento contendo quatro repetições.

2.2.6. Teste de colonização radicular.

Sementes de *E. benthamii*, oriundas de APS (área de produção de sementes) da empresa BENTEC, Rio do Sul-SC, com poder germinativo de 80%, foram desinfestadas em álcool (50%) por 30 segundos e em hipoclorito de sódio (2%) por 30 segundos, e depois foram microbiolizadas por 12 horas a temperatura ambiente, em suspensão de rizobactérias com concentração ajustadas para 10^8 $ufc.mL^{-1}$ conforme método proposto por Silva *et al.* (2003) e Romeiro (2007b). Após a microbiolização, realizou-se a semeadura em tubos de

ensaio contendo meio agarose 0,4% (p/v), previamente esterilizado. As raízes das plântulas foram avaliadas semanalmente, até completarem 45 dias, por inspeções visuais a procura da colonização bacteriana em torno das raízes. O delineamento utilizado foi o DIC, composto de quatro tratamentos: sendo três bactérias e a testemunha (sem bactéria) e dez repetições por tratamento.

2.2.7. Análise estatística

Os dados foram submetidas a análise de variância, quando as premissas foram atendidas, havendo a transformação dos dados quando necessário e se pertinente aplicou-se teste de média para comparação das mesmas pelo *software* ASSISTAT 7.7.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Isolamento das Rizobactérias e Bactérias residentes do filoplano.

Foram isoladas 300 bactérias, sendo: 134 rizobactérias, 73 do local "A" e 61 do local "B" e 166 bactérias residentes do filoplano, 60 do local "A" e 106 do local "B". A variação do número de isolados de rizosfera e filosfera obtidos nos sítios "A" e "B" podem ser devido a vários fatores como o estádio fenológico das duas culturas, características edafoclimáticas, variação de altitude dos sítios. Em um estudo com comunidades de rizobactérias em Benin, no oeste do continente africano, observou-se que havia variação na diversidade e riqueza de espécies de rizobactérias de acordo com o tipo de solo e com a zona agroecológica de onde foram coletados o material para isolamento (AGBODJATO *et al.*, 2015). Joshi *et al.* (2011) observam que além de espécies vegetais, tipos de solo os quais as rizobactérias estão associadas e são isoladas, a altitude do sítio também pode influenciar na riqueza de espécies e também nas características metabólicas destas quanto agentes de biocontrole e/ou promotoras de crescimento de plantas. Como há uma diferença de altitude entre os sítios de Guarapuava e Irati, este fator pode ter influenciado nos resultados do isolamento.

2.3.2. Teste de Solubilização de fosfato de cálcio *in vitro*.

No teste de solubilização de fosfato de cálcio, três rizobactérias formaram halo transparente em torno de suas colônias: RB041, RB030 e RB023. Houve diferença significativa entre os isolados de forma que o RB023 foi o qual apresentou maior solubilização de fosfato de cálcio (Figura 1), com a presença de um halo bastante proeminente em torno da colônia bacteriana(Figura 2).

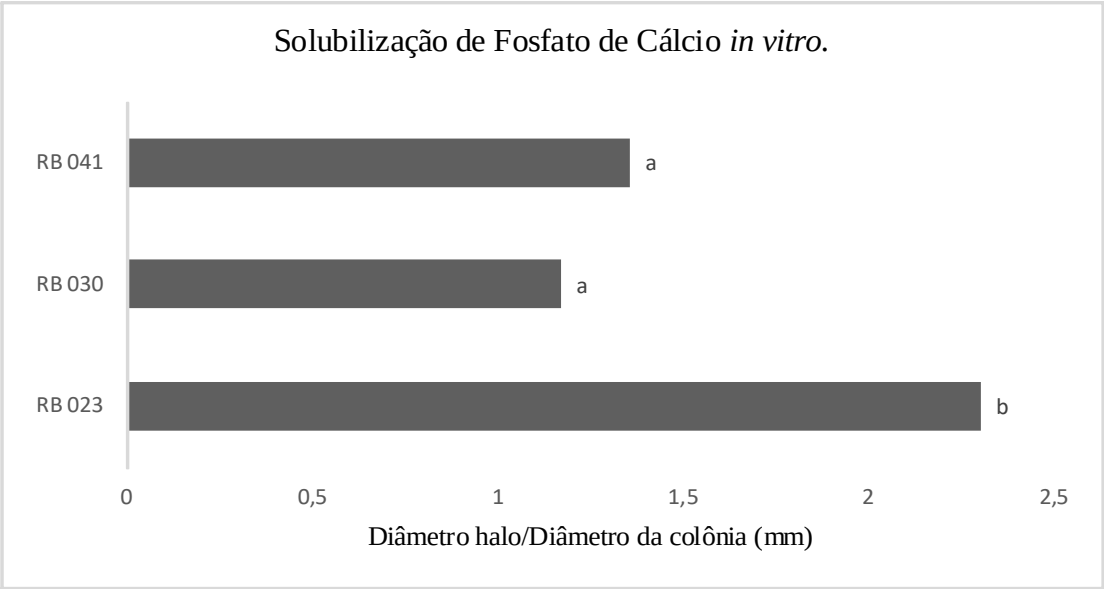

Figura 1. Relação diâmetro do halo formado/diâmetro da colônia bacteriana (mm). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. CV= 11,85%.

Essa diferença na capacidade de solubilizar fosfato de cálcio ocorre principalmente por que as bactérias podem solubilizar o P de formas diferentes, como por exemplo, produzindo ácidos orgânicos e/ou enzimas fosfatases (MENDONÇA, 2006; ROMEIRO, 2007a), testou 200 isolados de rizobactérias isoladas de feijoeiro e 55 delas (27,5%) solubilizaram fosfato de cálcio *in vitro*.

Silva *et al.* (2011), avaliando a ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio e alumínio *in vitro*, em espécies de importância econômica em cinco localidades diferentes no estado do Amazonas, verificaram uma grande variação da percentagem de isolados solubilizadores de fosfatos entre as localidades estudadas, na terceira localidade não houveram bactérias positivas, ou seja, que solubilizam fosfato. Como ocorreu com os isolados da localidade “A” deste experimento que não solubilizaram fosfato de cálcio. Já as bactérias

isoladas da localidade “B”, tiveram um percentual de 1,8% de isolados de rizobactérias solubilizadoras de fosfato.

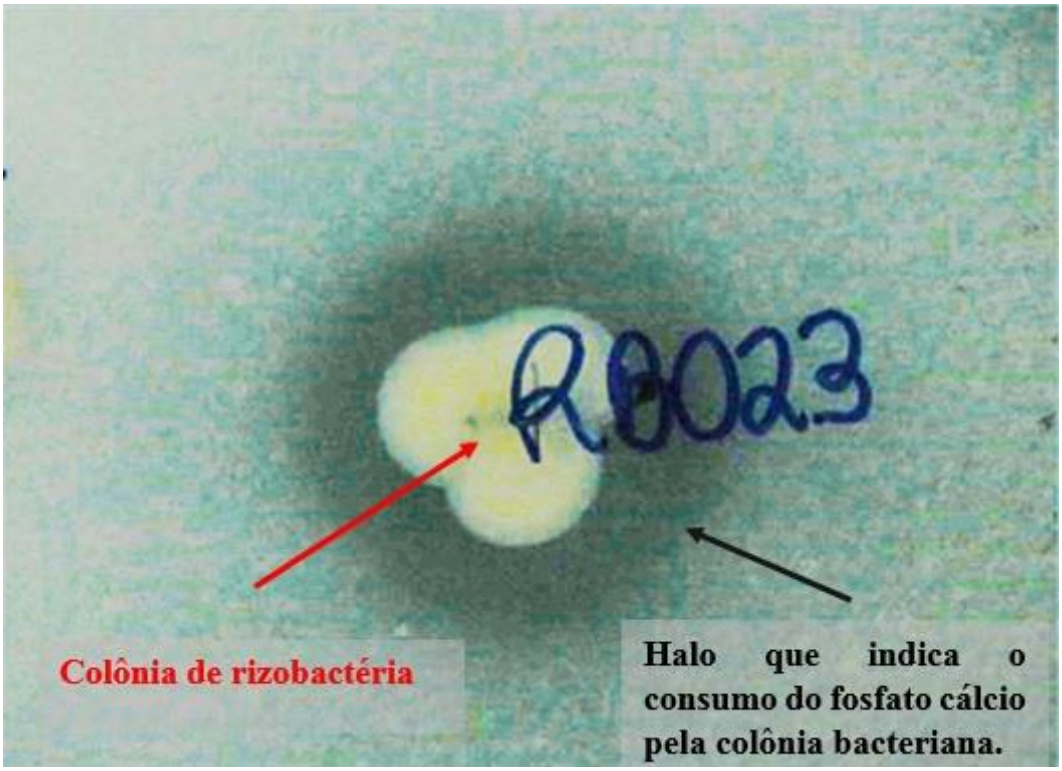

Figura 2. Halo translucido no entorno da colônia do isolado RB023 de rizobactéria em meio GL acrescido de CaHPO4, após dez dias de incubação. Seta vermelha indica a colônia bacteriana e seta preta indica o halo translucido de consumo da fonte de fósforo.

2.3.3. Teste de crescimento e alteração de pH em meio líquido contendo adubos fosfatados.

Observou-se diferença quanto ao crescimento das bactérias em meio contendo adubos fosfatados. Houve efeito significativo, para a fonte de P, isolado bacteriano e também houve interação significativa entre os dois fatores (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância de crescimento bacteriano em meio de cultura contendo adubos fosfatados, avaliados em D.O. 600 nm de absorbância.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
FOSFATO	2	2,77152	1,38576	23,2964**
BACTÉRIA	3	6,57395	2,19132	36,8389**
INT. F1XF2	6	1,62459	0,27076	4,5519**
TRATAMENTOS	11	10,97005	0,99728	16,7656**
RESÍDUO	36	2,14141	0,05948	
TOTAL	47	13,11147		
CV% = 18.67				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$), obs.: dados transformados.

O desmembramento da interação permite concluir que no meio GL sem acréscimo de fonte de P e os isolados RB023 e RB030 apresentaram maior absorbância (D. O. 600nm) em relação à testemunha e ao tratamento RB041, indicando que tiveram maior crescimento bacteriano. Com a adição das fontes de P (superfosfato simples e fosfato monoamônico), não houve diferença nos valores de absorbância entre os três isolados bacterianos, todavia todos diferiram da testemunha (Tabela 2).

Em um estudo em que se avaliou a atividade de fosfatase da microbiota do solo em relação aos níveis de P existentes, os autores observaram que com teores mais altos de P disponível menor era a atividade das enzimas fosfatase. A elevação da atividade destas enzimas somente ocorria quando havia baixos teores de P (GATIBONI *et al.*, 2008). É possível que no presente estudo tenha ocorrido o mesmo, no meio GL sem adição de P apenas as bactérias com atividade de fosfatase conseguiram crescer mais, já no meio com a adição do P a produção da enzima não fez efeito uma vez que o nutriente estava em abundância.

O meio GL possui baixa concentração de P, possivelmente oriundos da fração de ácido ribonucleico que vem do extrato de levedura, componente do meio. Segundo Yamada *et al.* (2003), cerca de 5,6% do extrato de levedura após hidrólise é composto por RNA. Desta

forma é possível que as enzimas fosfatases dos isolados RB023 e RB030, tenham obtido o P em maior quantidade desta fonte e por esta razão tenham crescido mais.

Observa-se que o meio GL sem adição de fontes de P possui, em alguns casos, uma absorbância maior que o mesmo meio acrescido das fontes de P. O isolado RB023 apresentou menor absorbância quando o meio foi acrescido de superfosfato simples, diferindo estatisticamente quando cultivado em meio sem acréscimo de P ou acrescido de fosfato monoamônico. O isolado RB030 teve maior densidade ótica no meio sem acréscimo de P e, o isolado RB041 não apresentou diferença estatística para o parâmetro avaliado (Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento de isolados bacteriano em meio de cultura contendo fontes de adubos fosfatados, avaliados em D.O. 600 nm de absorbância.

	ISOLADO BACTERIANO			
FONTE DE P	SEM BACTÉRIA	RB023	RB030	RB041
SEM FÓSFORO	0,1507 aB	0,7730 aA	1,2310 aA	0,2565 aB
SUPERFOSFATO SIMPLES	0,0347 bB	0,1690 bA	0,1580 bA	0,2845 aA
FOSFATO MONOÂMONICO	0,0415 bB	0,5807 aA	0,2312 bA	0,3445 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As demandas por P e mesmo a síntese de fosfatase são em parte características de cada espécie bacteriana, e no presente trabalho como não houve a identificação da espécie parece ser uma característica de cada isolado. A literatura tem apontado a capacidade de muitas rizobactérias em solubilizar fontes de P que estariam na forma não lábil para as plantas (HUSSAIN *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-VIVEROS *et al.*, 2010; GATIBONI *et al.*, 2008). Desse modo é importante ressaltar que os isolados RB023 e RB030 parecem ter condições de se desenvolverem em situações de menores concentrações de P, como acontece em muitos solos em que o mesmo não está prontamente disponível. Segundo Chen *et al.* (2006), estas bactérias solubilizadoras de P desenvolvem-se em superfícies com fontes insolúveis de P e a única forma de assimilar o nutriente é solubilizando-o, ao fazerem isto liberam quantidades excessivas do nutriente que acaba sendo disponibilizado para o vegetal da rizosfera circunvizinha.

A maior concentração de células foi observada no tratamento em que a bactéria RB030 foi cultivada no meio sem adubos, e a menor concentração ocorreu, no meio de

Superfosfato simples em que não foi cultivada nenhuma bactéria, segundo os valores de densidade ótica (Figura 3). Inui (2009), ao verificar densidade ótica de isolados bacterianos, observou que todos os isolados diferiram entre si para a fonte de fosfato de cálcio, e que foram capazes de crescer nos meios contendo, fosfato de cálcio, fosfato de catalão e fosfato de Araxá. Vale-se relatar que Chen *et al.* (2006), salientam que a maioria das bactérias solubilizadoras de fósforos são autóctones de substratos de fontes de fosfato cálcico. Souza *et al.* (2004) observaram que fungos ectomicorrízicos, tendem a diminuir a sua eficiência de solubilização, quanto maior as doses de P aplicado, prejudicando a colonização das raízes com o aumento no teor de P, podendo ter ocorrido também com as bactérias, que cresceram melhor no meio que não continha adubos.

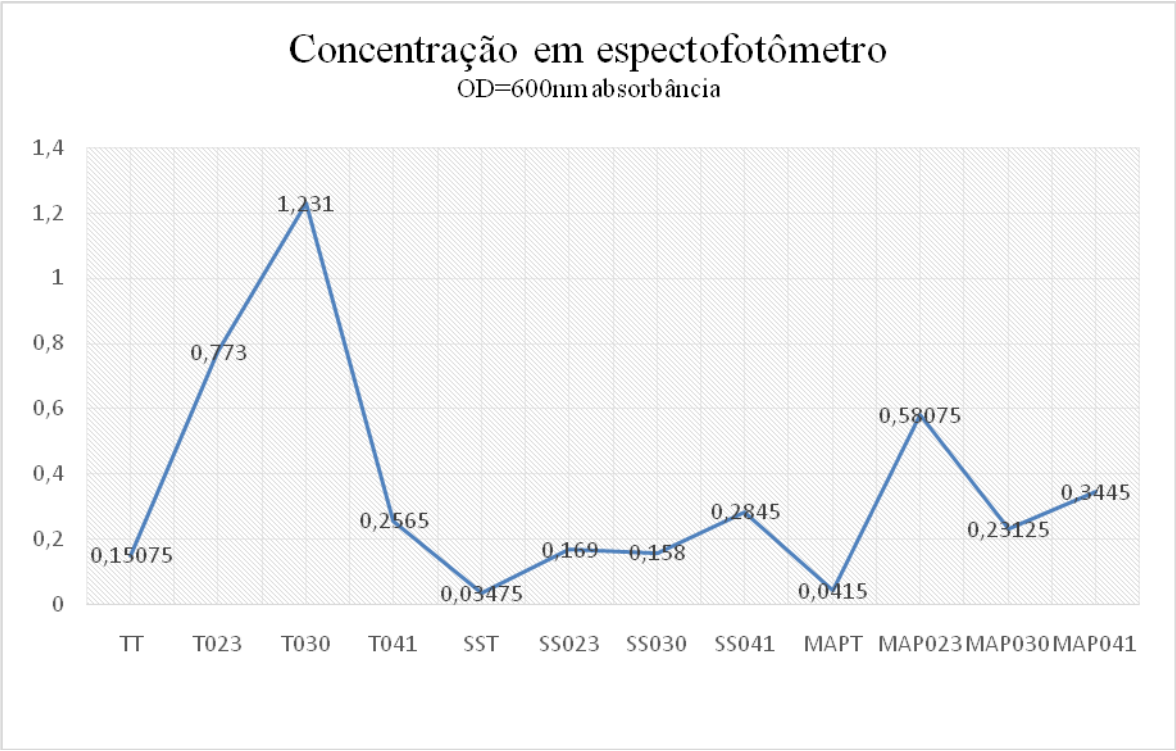

Figura 3. Médias do crescimento das bactérias em meio de cultura GL sem adubo e contendo Superfosfato simples e Fosfato monoamônico dado pela absorbância avaliada em D.O. 600nm. Sendo TT= meio sem adubo e sem bactéria; T023, T030 e T041= meio sem adubo, contendo as respectivas bactérias; SST= meio contendo Superfosfato simples, sem bactéria; SS023, SS030 e SS041= meio contendo Superfosfato simples e as respectivas bactérias; MAPT= meio contendo Fosfato monoamônico, sem bactéria; MAP023, MAP030 e MAP041= meio contendo Fosfato monoamônico com as respectivas bactérias.

Quanto a alteração do pH inicial do meio contendo adubos fosfatados, houve efeito significativo, para a fonte de P, as bactérias, bem como, houve interação significativa entre os dois fatores (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância para alteração do pH em relação ao pH inicial 6,5, por bactérias cultivadas em meio contendo adubos fosfatados.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GI	SQ	QM	F
FOSFATO	2	0,03524	0,01762	19,5877**
BACTÉRIA	3	0,11092	0,03697	41,0977**
INT. F1XF2	6	0,02297	0,00383	4,2547**
TRATAMENTOS	11	0,16913	0,01538	17,0906**
RESÍDUO	36	0,03239	0,0009	
TOTAL	47	0,20151		
CV% = 1,81				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$) obs.: dados transformados.

Nos meios de cultura sem cultivo bacteriano (testemunha) não houve variação dos valores de pH (Tabela 4), isto porque não houve atividade metabólica microbiana que normalmente levam à acidificação do meio e redução dos valores de pH (ROMEIRO, 2007a).

O isolado RB023 proporcionou a maior acidificação, que se deu no meio GL acrescido de superfosfato simples, seguido do meio sem acréscimo de fonte de P e do meio GL acrescido de fosfato monoamônico. Para o isolado RB030 os valores de pH foram menores no meio GL acrescido de superfosfato simples em relação ao cultivo nos outros dois meios. O isolado RB041 não diferenciou estatisticamente os valores de pH em nenhum dos três meios de cultura cultivados (Tabela 4).

As variações dentro dos valores de pH indicam que houve atividade metabólica e que as bactérias ao alterarem a acidez do meio interagiram com o mesmo.

Segundo Silva Filho *et al.* (2002), um dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para realizar a solubilização é a acidificação do meio. Inui (2009) relata que a acidificação é um dos mecanismos utilizados pelos microrganismos na solubilização de fosfatos, mas que existem enzimas, que necessitam de pH ideal para sua atividade. Este fato indica que pode ter havido solubilização de fosfato.

Ao correlacionar estes resultados, pode-se concluir que a acidificação do meio de cultura não implica em maior crescimento bacteriano. Todavia essa solubilização gera

excedentes, muitas vezes muito superiores aos necessários à colônia bacteriana (CHEN *et al.*, 2006) e, os efeitos são mais pronunciados em meios com menores teores de fósforo (GATIBONI *et al.*, 2008).

Em relação à variação do pH em cada meio de cultura separadamente, observa-se que os meios de cultura sem cultivo bacteriano tiveram os maiores valores de pH, exceto para o isolado RB023 no meio GL acrescido de fosfato monoamônico que não diferiu estatisticamente da testemunha. Segundo Romeiro (2007a), o crescimento de culturas bacterianas levam à acidificação do meio de cultivo devido ao metabolismo necessário a este crescimento.

Tabela 4. Alteração do pH em relação ao pH inicial 6,5, por bactérias cultivados em meio contendo adubos fosfatados.

FONTE DE P X BACTÉRIA				
	SEM BACTÉRIA	RB023	RB030	RB041
SEM FÓSFORO	5,90 aA	4,25 bB	4,62 aB	4,10 aB
SUPERFOSFATO SIMPLES	5,25 aA	3,65 cB	4,00 bB	4,12 aB
FOSFATO MONOÂMONICO	5,50 aA	5,00 aAB	4,62 aB	4,50 aB

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, letras minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas.

As bactérias foram capazes de diminuir o valor do pH dos meios (Figura 4), em que os pontos mais altos do gráfico (pH mais alto) referem-se aos controles, sem cultivo de bactérias. Souchie *et al.* (2005), também observaram que todos os isolados testados, tanto fúngicos, como bacterianos, reduziram os valores de pH do meio líquido em relação ao controle, sem inoculação. Inui (2009) também verificou que isolados bacterianos diminuíram o pH do meio de cultura contendo fosfato de cálcio, fosfato de catalão e fosfato de Araxá

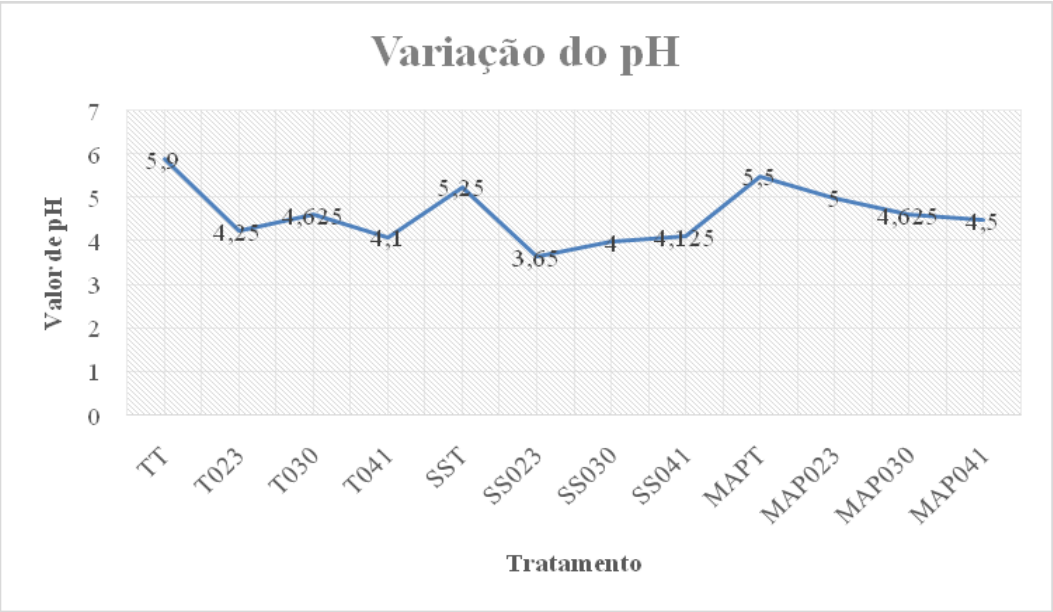

Figura 4. Médias de alteração dos valores de pH em relação ao pH inicial (6,5) por bactérias em meio de cultura GL sem adubo, e meio contendo Superfosfato simples e Fosfato monoamônico. Sendo TT= meio sem adubo e sem bactéria; T023, T030 e T041= meio sem adubo, contendo as respectivas bactérias; SST= meio contendo Superfosfato simples, sem bactéria; SS023, SS030 e SS041= meio contendo Superfosfato simples e as respectivas bactérias; MAPT= meio contendo Fosfato monoamônico, sem bactéria; MAP023, MAP030 e MAP041= meio contendo Fosfato monoamônico com as respectivas bactérias.

2.3.4. Teste de colonização radicular.

Todos os tubos em que as sementes foram microbiolizadas com os isolados RB023 e RB030, as raízes das plantas resultantes apresentavam halo branco leitoso no seu entorno, evidenciando a colonização radicular. Nas plantas testemunhas, bem como naquelas oriundas de sementes microbiolizadas com o isolado RB041 esse efeito não foi observado, o que indicou que não houve colonização radicular.

As rizobactérias conhecidas como PGPR, têm sido definidas como aquelas que são de vida livre, porém colonizam as raízes das plantas hospedeiras, competindo com a microbiota circunvizinha e promovendo efeitos benéficos à planta como a promoção de crescimento (KLOEPPER *et al.*, 1989; LAZAROVITS, NOWAK 1997; BAKKER *et al*. 2007).

A colonização das raízes implica que a bactéria pode colonizar todo o sistema radicular e sobreviver durante várias semanas na rizosfera na presença e competindo com a

microbiota existente (WELLER, 1988). Segundo Baker (1991), a capacidade de colonização do sistema radicular amplia-se à bactérias que ao serem aplicadas nas sementes sobrevivem até a sua germinação colonizando o sistema radicular posteriormente formado. Assim a capacidade de colonizar o sistema radicular confere uma vantagem competitiva para a bactéria sobreviver no ambiente rizosférico, sendo uma condição, senão essencial, preponderante para que as rizobactérias possam atuar como promotoras de crescimento de plantas.

2.4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A bactéria RB023 é mais eficiente em solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* do que as bactérias RB030 e RB041, todas as bactérias foram capazes de alterar o pH do meio sem adubos, e contendo os dois adubos, ainda que com diferenças estatísticas, todas as bactérias foram capazes de crescer nos três meios de cultura.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBODJATO, N.A.; NOUMAVO, P.A.; BABA-MOUSSA, F.; SALAMI, H.A.; SINA, H.; SÈZAN, A.; BANKOLÉ, H.; ADJANOHOUN, A.; BABA-MOUSSA, L. Characterization of Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Maize (Zea mays L.) in Central and Northern Benin (West Africa). **Applied and Environmental Soil Science**. 9p. 2015. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/aess/2015/901656/>. Acesso em: 16/01/2016.

BAKER, R. Induction of rhizosphere competence in the biocontrol fungus Trichoderma. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (eds) **Rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic, pp.221-228. 1991.

BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; BLOEMBERG, G.V.; HOFTE, M.; LEMANCEAU, P.; COOKE, M. New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.241-242, 2007.

BENIN, C.C. **Efeito do espaçamento na produção, variáveis dendrométricas e propriedades da madeira de *Eucalyptus benthamii.*** 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, 2014.

CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v.34, p.33-41, 2006.

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.S.; BRUNETTO, G. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1085-1091, 2008.

HUSSAIN, M.I.; ASGHAR , H.N.; AKHTAR, M.J.; ARSHAD, M. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. **Soil and Environmental Sciences**, v.32, p. 71-78, 2013.

INUI, R.N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar.** 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

JOSHI, P.; TYAGI, V.; BHATT, A.B. Characterization of Rhizobacteria Diversity Isolated from *Oryza sativa* Cultivated at Different Altitude in North Himalaya. **Advances in Applied Science Research**, v.2, p.208-216, 2011.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trend Biotechnology**, v.7: p.39–43, 1989.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, v.32, p.188-192, 1997.

MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1980. 251p.

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1976. 528p.

MALAVOLTA, E.; VITI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997, 319p.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M.A.; CROWLEY, D.E.; GAJARDO' G.; MORA, M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v.10, p.293 – 319, 2010.

MENDONÇA, H. L. **Seleção de rizobactérias promotoras do crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro.** 2006. 77f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006

RODELLA, A. A.; ALCARDE, J. C. Requisitos de qualidade física e química de fertilizantes minerais. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. (ed) **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças em plantas: Fudamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 269p. a.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças em plantas: Procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 172p. b.

SILVA, A. C. S. da; CHAGAS JR., A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.2, n.1, p. 37-42, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

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

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 40, n. 11, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, L. A. B. de, SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. de. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de P e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, n.4, p.349-355, 2004.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras da Amazônia. **Acta Amazônica**. Manaus, v.12, n. 1, p. 15-22, 1982.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI; M.C.C.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v.16, p.423-432, 2003.

WEID, J.M.V.D. Um novo lugar para a agricultura. In: PETERSEN, P. (org.) **Agricultura familiar camponesa na construção do futuro**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2009. p.47-65.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathol**, v.26, p.379-407, 1988.

WOICIECHOWSKI, T. **Avaliação dos atributos de um Cambissolo Háplico e crescimento inicial de *Eucalyptus benthamii* após a aplicação de biocarvão na região de Irati-PR.** 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, 2011.

3. CAPÍTULO - 2

Promoção de crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* por bactérias solubilizadoras de fosfato sob diferentes doses e fontes de P.

RESUMO

Giovanna Marcolin. Promoção de crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* por bactérias solubilizadoras de fosfato sob diferentes doses e fontes de P.

O eucalipto, arvore mais plantada no Brasil e no mundo, possui rápido crescimento, porem há variáveis que afetam negativamente o seu desenvolvimento. Um plantio bem desenvolvido no futuro começa pela boa qualidade das mudas, com menor tempo no viveiro, menores são os riscos de ataque de pragas e da ocorrência de doenças, o que por consequência reduz o uso de agrotóxicos e o custo da produção. As rizobactérias podem auxiliar o melhor desenvolvimento de mudas e as solubilizadoras de fosfato podem ainda disponibilizar o nutriente para as mesmas. Por isso, objetivou-se promover o crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*, através de bactérias solubilizadoras de fosfatos, via aplicação em sementes e em substrato, com diferentes fontes e doses de P. As três bactérias testadas foram capazes de promover o crescimento das mudas. Em média, o peso seco total das mudas inoculadas foi 23% superior as que não foram inoculadas com bactérias. O superfosfato simples proporcionou maiores médias de diâmetro, peso verde da parte aérea, peso seco da parte aérea e peso seco total, possivelmente pela presença de enxofre em sua composição. A dose 0% de P foi que obteve as maiores médias, provavelmente por que possibilitou melhor interação entre as mudas e os isolados bacterianos.

Palavras chave: eucalipto, adubação de mudas, rizobactérias

ABSTRACT

Giovanna Marcolin. Growth promotion of *Eucalyptus benthamii* seedlings by phosphate solubilizing bacteria with different phosphorus dosages and sources.

Eucalypt are the most planted trees in Brazil and around the world, they have fast growth, however there are some variables that negatively affect its growth. A well-developed plantation in the future begins by the seedlings quality and shorter time in nursery, that decreases the attack risks of pests and diseases, that consequently reduces the use of agrochemicals and the production costs. Rhizobacteria can support a better seedlings growth and the phosphate solubilizing bacteria can also provide the nutrient to them. Therefore, the aim of this research was promote the growth of *Eucalyptus benthamii* seedlings by phosphate solubilizing bacteria, through the application in seeds and substrate, with different sources and dosages of phosphorus. The three tested bacteria were able to promote the seedlings growth, on average the total biomass of inoculated seedlings was 23% higher in comparison to the non-inoculated seedlings. Simple superphosphate provided higher averages of diameter, fresh aboveground weight, aboveground biomass and total biomass, possibly by the presence of Sulphur on its composition. The 0% phosphorus dosage achieved the higher averages, probably because it enabled the better interaction between the seedlings and the bacterial isolates.

Keywords: Phosphorus, seedlings quality, seedlings fertilization, rhizobacteria

3.1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é a árvore mais plantada no Brasil e no mundo. Existem cerca de 7,7 milhões de hectares de florestas plantadas no país, sendo que 72% são de *Eucalyptus* spp. e seus híbridos (IBÁ, 2015). As espécies de *Eucalyptus* importantes para a região sul do Brasil, constituem-se de um grupo restrito, dentre estas *E. dunni*, *E. benthamii*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. grandis*. Contudo algumas destas tem um zoneamento climático limitado devido à frequente ocorrência de geadas em certos sítios da região. Assim, *E. benthamii* tem apresentado resistência ao estresse por congelamento (PALUDZYSZYN FILHO *et al*., 2006; BRONDANI, 2008).

Embora *Eucalyptus* spp. sejam árvores de rápido crescimento, esta rapidez pode ser variada dependendo de alguns aspectos. Alguns dos aspectos que afetam são o material genético, qualidade das mudas plantadas e as condições do solo (BELLOTE, SILVA, 2005).

Segundo Carmo (2012), é necessário que se estudem métodos que visem melhorar a qualidade de mudas florestais, pois com menor tempo no viveiro, se reduz o risco de ataques de fitopatógenos e pragas e consequentemente o uso de agrotóxicos, como a redução dos custos de produção.

Tem-se postulado que rizobactérias possam ser organismos que auxiliem de forma benéfica a produção de mudas florestais (SILVA *et al*., 2003; ROMEIRO, 2007a; MAFIA *et al*., 2009). Na área florestal o estudo de rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas tem menos de 20 anos (ENEBACK *et al*., 1998).

Por ser uma área ainda recente, existem informações incompletas de como as rizobactérias sobrevivem, competem e interagem na rizosfera arbórea, bem como a sua interação com a fração química desta rizosfera. Sabe-se que vários nutrientes são essenciais para o crescimento vegetal e de procariotos, como carbono, nitrogênio, potássio e fósforo.

O P é um macronutriente mineral essencial, que quando presente em concentrações insuficientes para a planta, reduz consideravelmente o seu crescimento (MALAVOLTA, 1976; MALAVOLTA, 1980; PRIMAVEZI, 2002; GONÇALVES, BENEDETTI, 2005). Assim, o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato podem auxiliar no crescimento e

melhorar a qualidade de mudas, como também aumentar o aproveitamento de adubos fosfatados.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo geral

- Promover o crescimento de mudas de *E. benthamii*, por meio de bactérias solubilizadoras de fosfatos via aplicação em sementes e em substrato, com diferentes fontes e doses de P.

3.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de mudas de *E. benthamii*, quanto a fonte de fósforo fornecida: sem P, superfosfato simples e fosfato monoamônico.

- Avaliar o crescimento de mudas de *E. benthamii*, quanto a dose de P aplicada: zero P, 50% da dose recomendada e 100% da dose recomendada.

- Avaliar o crescimento de *E. benthamii*, quanto a inoculação de bactérias nas sementes e no substrato de mudas.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Realização dos testes

Os testes foram realizados nos laboratórios de Patologia Florestal e Solos Florestais e na casa de vegetação do Departamento de Engenharia Florestal, da UNICENTRO, *Campus* de Irati.

3.3.2. Promoção do crescimento de mudas de *E. benthamii* .

Sementes de *E. benthamii*, oriundas de APS, da empresa BENTEC, Rio do Sul-SC, com poder germinativo de 80%, foram microbiolizadas por 12 horas em temperatura ambiente, em suspensão de rizobactérias RB023, RB030 e RB041, com concentração ajustadas em espectrofotômetro, para 10^8 ufc.mL^{-1}.

Após a microbiolização realizou-se a semeadura, em tubetes de 55cm³, contendo substrato comercial MaxPlant®, realizando fertilização de base segundo Valeri, Corradini (2005). Para tanto, a cada m³ de substrato adicionou-se 150 g de N, 300 g de P_2O_5 e 100 g de K_2O. As doses de nitrogênio e de potássio foram aplicadas igualmente em todos os

tratamentos, a dose de P, foi aplicada em três doses diferentes conforme o tratamento, 0% de P (0 g de P_2O_5), 50% da dose recomendada (150 g de P_2O_5) e 100% da dose recomendada (300 g de P_2O_5). As fontes de nitrogênio e potássio foram as mesmas para todos os tratamentos, sendo utilizada uréia e cloreto de potássio, respectivamente. Para o P, foram utilizadas duas fontes do nutriente: superfosfato simples e fosfato monoamônico. A testemunha consistiu da semeadura em substrato, com sementes que permaneceram por 12 horas em água, igual período em que os tratamentos permaneceram em suspensão bacterianas.

Aos 15 dias após a semeadura (DAS) avaliou-se a emergência de plântulas. Aos 45 DAS, realizou-se a primeira avaliação do diâmetro por meio de um paquímetro digital e da altura das mudas com uma régua graduada. Também foi realizado nesse período a primeira adubação de cobertura, utilizando-se 1000 g de sulfato de amônio e 300 g de cloreto de potássio diluídos em 100 L de água (VALERI; CORRADINI, 2005), com volume aplicado de 10 mL por tubete, em intervalos de 15 em 15 dias, até os 75 DAS. Aos 50 DAS, aplicou-se a suspensão bacteriana correspondente a cada tratamento em concentração de 10^8 u.f.c. mL^{-1} ajustada em espectrofotômetro (D.O. 600nm), com volume de 3 mL por tubete.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial triplo 4x3x2, sendo os isolados bacterianos, três doses e as duas fontes de P, totalizando 24 tratamentos (Quadro 1). Cada tratamento teve cinco repetições em que foram semeadas 12 sementes, totalizando 60 sementes semeadas por tratamento.

As variáveis avaliadas foram a emergência, o diâmetro do coleto e altura de plântulas avaliadas aos 45 DAS. Aos 90 DAS avaliou-se a sobrevivência, peso seco da parte aérea, peso seco da raiz e comprimento de raiz, peso verde da parte aérea e da raiz, diâmetro do colo e altura das mudas.

Quadro 1. Experimento em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial triplo, totalizando 24 tratamentos. MAP (fosfato monoamônico) e SS (superfosfato simples)

Bactéria	Dose de P	Fonte de P	Tratamento
RB023	0%	MAP	1
		SS	2
	50%	MAP	3

		SS	4
	100%	MAP	5
		SS	6
RB030	0%	MAP	7
		SS	8
	50%	MAP	9
		SS	10
	100%	MAP	11
		SS	12
RB041	0%	MAP	13
		SS	14
	50%	MAP	15
		SS	16
	100%	MAP	17
		SS	18
SEM BACTÉRIA	0%	MAP	19
		SS	20
	50%	MAP	21
		SS	22
	100%	MAP	23
		SS	24

3.3.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância, quando as premissas foram atendidas, havendo a transformação dos dados quando necessário e se pertinente aplicou-se teste de média para comparação das mesmas pelo *software* ASSISTAT 7.7.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Emergência de plântulas

Não houve efeito significativo para a emergência de plântulas de *E. benthamii*, aos 15 DAS. A percentagem de germinação variou de 55% à 78% (Figura 5).

Tanto para as fontes de P como para as doses, era esperado que não houvesse diferença na emergência de plântulas. Aos 15 DAS, as mesmas ainda possuem reservas nutricionais da própria semente, não necessitando absorver do meio, os nutrientes.

Sabe-se que as bactérias, podem interagir com as plântulas, de forma neutra, deletéria ou benéfica (ROMEIRO, 2007a; ALFENAS *et al.*, 2009), por tanto, como não diferiram da testemunha, comportaram-se como neutras, não beneficiando e nem prejudicando a percentagem de emergência.

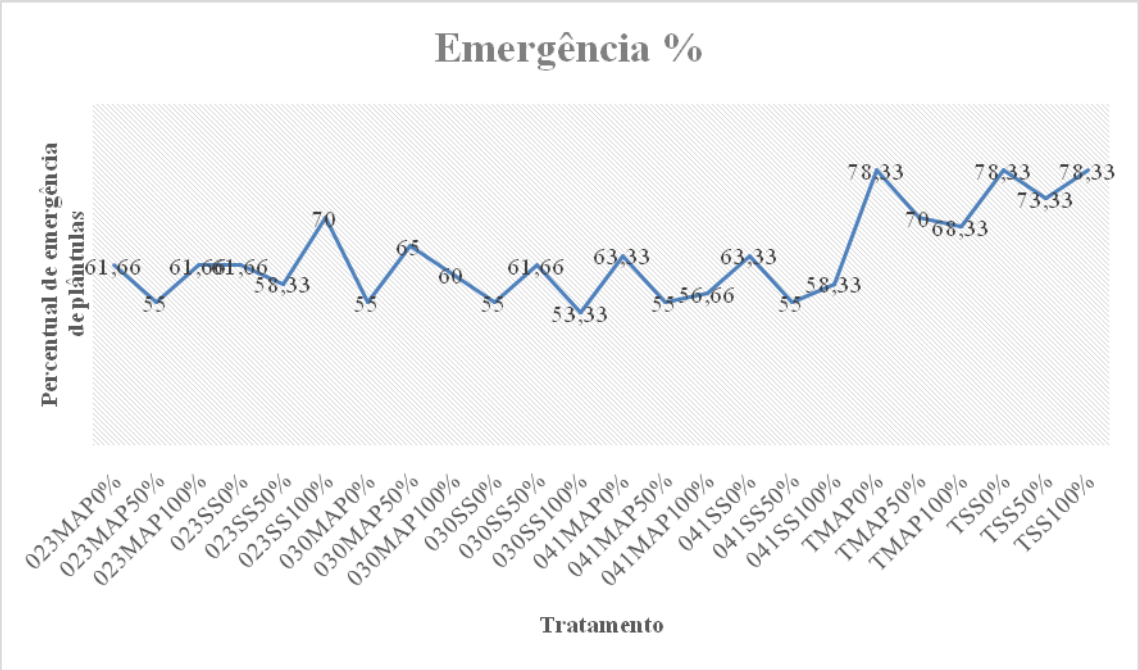

Figura 5. Emergência de plântulas de *E. benthamii*, aos 15 DAS. Sendo 023, 030, 041 os isolados bacterianos, T a testemunha (sem bactéria), MAP e SS, fosfato monoamônico e superfosfato simples respectivamente, e 0%, 50% e 100% as doses de P aplicado.

3.4.2. Avaliação aos 45 DAS

Nesta avaliação, a altura foi a variável que apresentou interação significativa entre isolado bacteriano e fonte de P, contudo para diâmetro do coleto não houve interação significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância para diâmetro e altura aos 45 DAS em casa de vegetação.

QUADRADOS MÉDIOS		
FV	Diâmetro	Altura
BACTÉRIA	2,6932 ns	5,2643**
FONTE DE P	0,4900 ns	0,1794 ns
DOSE DE P	1,5995 ns	1,2547 ns
INT. F1xF2	0,4331 ns	0,0278*
INT. F1xF3	0,8985 ns	1,6263 ns
INT. F2xF3	0,5214 ns	0,2799 ns
INT. F1xF2xF3	0,4219 ns	0,7403 ns
CV%	28,72	5,05

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$),* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 =< p < .05$), ns não significativo ($p >= .05$). obs.: dados de diâmetro e altura transformados.

A bactéria RB030, diferiu da testemunha, tanto nos tratamentos contendo MAP (fosfato monoamônico), quanto nos tratamentos contendo SS (Superfosfato simples). A maior média de altura aos 45 DAS, ocorreu no tratamento contendo a bactéria RB030, onde aplicou-se tanto superfosfato simples como fosfato monoamônico, como fonte de P (Tabela 6).

Tabela 6. Influência de isolados de rizobactérias e fontes de P na altura de mudas de *Eucalyptus benthamii* aos 45 dias após a semeadura.

	FONTE DE FÓSFORO	
ISOLADO	MAP	SS
RB023	25,9729 abA	26,4921 abA
RB030	28,8101 a A	29,5550 a A
RB041	26,1350 abA	26,1586 abA
SEM BACTÉRIA	24,5461 bA	25,0242 bA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula para colunas e maiúscula para linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4.3. Avaliação aos 90 DAS

Aos 90 DAS, houve diferença significativa para bactéria (fator 1) em diâmetro, peso verde da parte aérea (PV PA), peso verde total (PV TOT) e peso seco da parte aérea e raiz.

Houve diferença para a fonte de P aplicada (fator 2), em diâmetro e peso seco da parte aérea.

Também foram detectadas diferenças significativas para a dose de P aplicada (fator 3), em diâmetro, peso verde da parte aérea e peso seco da parte aérea. Houve interação entre F1xF2xF3, em altura, comprimento de raiz, peso verde da raiz e peso seco total (Tabela 7).

Tabela 7. Análise variância aos 90 DAS, para diâmetro (mm), altura (mm), comprimento de raiz (mm), peso verde da parte aérea, da raiz e total (mg) e peso seco da parte aérea, raiz e total (mg).

	QUADRADOS MÉDIOS								
FV	Diâmetro	Altura	C. raiz	PF PA	PF R	PF TOT	PS PA	PS R	PS TOT
Bactéria	**6,4703****	**4,5770****	0,2566ns	**7,1301****	**6,0073****	**7,8962****	**7,0641****	**8,2825****	**8,2091****

Fonte de P	**5,1328***	1,4758ns	0,0451ns	3,0640ns	0,7411ns	2,1242ns	**6,6607***	2,8681ns	**6,2067***
Dose de P	**6,6485****	1,1866ns	**3,6887***	**4,2076***	0,8825ns	1,2719ns	**4,8497****	0,4056ns	**3,2512***
F1xF2	0,7572ns	0,2316ns	0,4301ns	0,3897ns	0,3640ns	0,3801ns	0,0828ns	0,1957ns	0,1008ns
F1xF3	1,4848ns	0,5004ns	0,8045ns	0,7511ns	**2,2710***	1,2361ns	0,4563ns	0,3887ns	0,4541ns
F2xF3	1,5057ns	0,4682ns	0,9755ns	0,9382ns	0,4671ns	0,8218ns	1,7359ns	1,2524ns	1,6816ns
F1xF2xF3	0,9183ns	**0,1081****	**0,1552***	0,5079ns	**0,1850***	0,2316ns	0,2081ns	0,3280ns	**0,1824***
CV%	13,93	14,47	5,98	25,28	39,09	27,35	27,92	6	27,7

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01),* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05), ns não significativo (p >= .05). obs.: dados de peso seco de raiz foram transformados.

A bactéria RB030 diferiu da testemunha em todas as variáveis, exceto para o comprimento de raiz (Tabela 8), porem devido ao crescimento rápido das mudas e ao tamanho limitado dos tubetes, aos 90 DAS, a maior parte das mudas já apresentavam crescimento de raiz para fora dos tubetes, o que pode ser a razão da não significância em se tratando do comprimento da raiz. A bactéria RB023 diferiu da testemunha, somente em diâmetro e peso verde total (Tabela 8). A bactéria RB041 não diferiu da testemunha em nenhuma variável avaliada (Tabela 8).

Tabela 8. Influência da bactéria (fator 1) no diâmetro, peso verde da parte aérea, e total, peso seco da parte aérea e raiz aos 90 DAS.

Isolados	Diâmetro	PV PA	PV TOT	PS PA	PS R
RB023	**1,53 a**	1077,10 ab	1903,79 ab	288,22 b	110,43 b
RB030	**1,55 a**	**1250,67 a**	**2184,79 a**	**352,83 a**	**132,46 a**
RB041	1,46 ab	**1119,82 a**	1831,37 bc	295,59 b	106,48 b
Sem bactéria	1,34 b	923,88 b	1547,32 c	255,74 b	91,69 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Mafia *et al*. (2009), avaliando o índice de enraizamento e a biomassa das raízes de clones de eucalipto inoculadas com rizobactérias, observaram ganhos de 134% na biomassa das raízes, para o clone 865 inoculado com o isolado S1. Mafia *et al*. (2005), obtiveram ganhos de até 69% em biomassa radicular, utilizando o isolado S1 em clones de eucalipto.

Segundo Moreira (2012), a biomassa da parte aérea de dois clones de eucalipto tiveram incremento de 53% a 167% comparados a testemunha quando tratadas com um isolado de *Bacillus* sp.

Carmo (2012), não obteve ganhos em crescimento, com nenhum dos isolados testados, em que sementes de *E. benthamii* foram microbiolizadas com suspensão bacteriana.

A variação do crescimento é muito maior quando as mudas foram originadas de sementes, o ideal é que o isolado promova o crescimento não apenas de um clone específico, mas da espécie em geral. Nesse trabalho, os ganhos em biomassa total chegaram a 40%, quando se aplicou a bactéria RB030, e em média os isolados aumentaram em 23% a biomassa total das mudas.

Mais estudos são necessários para a determinação dos fatores, bem como técnicas de manejo que possam favorecer a atividade solubilizadora de microrganismos rizosféricos (ALVES, SILVA FILHO, 2009).

O Superfosfato simples (SS) apresentou maiores médias e diferiu do fosfato monoamônico (MAP), em diâmetro e biomassa da parte aérea (Tabela 9). As mudas que receberam como fonte de P o superfosfato simples, em média tiveram 12% mais peso seco total do que as mudas que receberam fosfato monoamônico. O superfosfato simples possui em sua composição enxofre (S) e cálcio (Ca), porém foi realizada adubação de cobertura aos 45 DAS, onde aplicou-se sulfato de amônia, que também é fonte de enxofre, por isso é provável que essa diferença tenha sido causada principalmente pela disponibilização de cálcio as mudas. O cálcio participa de funções enzimáticas em processos de transferência do fosfato, como por exemplo, a enzima fosfolipase, além disso melhora a interação com a microbiota do solo (GIRACCA, NUNES, 2016).

Tabela 9. Influência da fonte de P (fator 2) no diâmetro e peso seco da parte aérea aos 90 DAS.

Fonte de fósforo	Diâmetro	PS PA
MAP	1,42*	278,49*
SS	**1,51**	**317,70**

* Significativo pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Gava *et al*. (1997), determinaram a eficiência de três fontes de P sobre o crescimento de mudas de eucalipto em dois tipos de solo, neossolo quartzarenico e latossolo vermelho. O termofosfato proporcionou maior crescimento no neossolo, sendo superior em 64% ao

superfosfato simples e 57% ao fosfato parcialmente acidulado, enquanto que no latossolo, o superfosfato simples foi superior ao termofosfato em 55% e 34% ao fosfato parcialmente acidulado.

Novais *et al.* (1995), verificaram a superioridade do superfosfato simples comparado ao superfosfato triplo, sobre a produtividade de eucalipto em latossolo vermelho, e a atribuíram ao fornecimento de enxofre (S) e Ca (cálcio).

As maiores médias, para a dose de P, ocorreram quando não se aplicou nenhum adubo fosfatado. Houve diferença entre a dose de 0% e a de 50%, para diâmetro, peso verde parte aérea e peso seco da parte aérea. Para 0% e 100%, houve diferença no diâmetro e peso seco da parte aérea (Tabela 10).

Tabela 10. Influência da dose de P (fator 3) no diâmetro, peso verde da parte aérea e peso seco da parte aérea aos 90 DAS.

Dose de fósforo	Diâmetro	PF PA	PS PA
0%	**1,56 a**	**1191,53 a**	**331,45 a**
50%	1,44 b	1016,51 b	279,07 b
100%	1,40 b	1070,56 ab	283,77 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro capitulo deste trabalho, as bactérias cresceram melhor e apresentaram maiores valores de D.O. onde foram cultivadas sem a presença dos adubos, o que pode explicar em parte o maior desenvolvimento das mudas na dose 0%. Outro fator preponderante é que 90 DAS pode ter sido insuficiente para avaliar a deficiência de P. Os primeiros sintomas de deficiência começaram a surgir no final do experimento, mesmo assim em um número pequeno de mudas.

A eficiência da adubação não depende apenas das doses ou quantidades a serem aplicadas. Existem uma série de outros fatores, como por exemplo, a qualidade dos fertilizantes, o solo, época, forma e uniformidade da aplicação, umidade e espécie de planta, que devem ser cuidadosamente analisados, para que se conduzam a um melhor uso dos adubos (ALCARDE *et al*., 1998).

Para o fator 1, a testemunha (sem bactéria), na dose de 50%, diferiu quanto a fonte de P aplicada, em que a maior média foi observada, no tratamento em que foi aplicado superfosfato simples (Tabela 11).

Tabela 11. Médias de interação F1xF2xF3, para peso seco total aos 90 DAS.

		DOSE P		
FONTE P	BACTÉRIA	0%	50%	100%
MAP	RB023	441,81 abA	324,97 abA	352,77 abA
	RB030	533,71 aA	381,19 abA	444,78 abA
	RB041	434,29 abA	374,04 abA	322,83 abA
	SEM BACTÉRIA	365,43 abA	288,88 bA	338,11 abA
SS	RB023	441,81 abA	447,34 aA	383,26 aA
	RB030	533,71 aA	488,83 aA	529,52 aA
	RB041	434,29 abA	428,10 aA	418,10 aA
	SEM BACTÉRIA	365,43 abA	352,15 aA	374,67 aA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, letras minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas.

A bactéria RB041, no tratamento em que foi aplicado fosfato monoamônico, diferiu quanto as doses de P recomendada, em que a menor média foi observada na dose de 50% (tabela 12).

Tabela 12. Médias de interação F1xF2xF3 para peso verde de raiz aos 90 DAS.

		DOSE P		
FONTE P	BACTÉRIA	0%	50%	100%
MAP	RB023	1002,19 aA	725,15 abA	771,47 aA
	RB030	752,23 aA	961,83 abA	1051,54 aA
	RB041	724,28 aA	480,49 bA	715,89 aA
	SEM BACTÉRIA	512,70 aA	580,90 abA	723,38 aA
SS	RB023	1002,19 aA	718,25 abA	740,85 aA
	RB030	752,23 aA	1127,20 aA	959,68 aA
	RB041	724,28 aA	757,44 abA	866,88 aA
	SEM BACTÉRIA	512,70 aA	633,95 abA	777,00 aA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, letras minúsculas para colunas e maiúsculas para linhas.

Faltou representar os resultados das interações triplas de altura e comprimento de raiz.
Ficou pobre a discussão.

3.5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os três isolados bacterianos foram capazes de promover o crescimento de mudas de *E.benthamii*. Em média a peso seco total das mudas inoculadas com os isolados, foi 23% maior do que a média do tratamento que não continha nenhuma bactéria.

A bactéria RB030, excetuando o comprimento de raiz, aumentou todas as variáveis avaliadas quando comparada a testemunha. O peso seco total das mudas inoculadas com a mesma, foi em média 40% superior ao peso seco total médio das testemunhas.

Quanto a fonte de P, o superfosfato simples foi o que proporcionou maior diâmetro, peso seco da parte aérea e peso seco total, comparado ao fosfato monoamônico, possivelmente devido a presença de enxofre e cálcio na sua composição.

A dose 0% de P proporcionou maiores diâmetros, peso verde da parte aérea, peso seco da parte aérea e peso seco total. A dose de 50% de P, apresentou maiores comprimentos de raiz. As bactérias tendem a diminuir o seu crescimento, quanto maior a dose de P aplicada.

Recomenda-se que sejam testadas doses menores de P em conjunto com a inoculação das bactérias, a fim de se verificar a dose ideal para que ocorra a interação entre mudas, bactérias e o nutriente.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCARDE, J.C.; GUIDOLIN, J. A.; LOPES, A.S. **Os adubos e a eficiência das adubações**. (3 ed.) São Paulo: ANDA, 1998. 43p.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ALVES, L.; SILVA FILHO, G. N. Produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) em presença de diferentes fontes fosfatadas e microrganismos solubilizadores de fosfatos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 557-562, 2009.

BELLOTE, A. F. J.; SILVA, H. D. da. Técnicas de amostragem e avaliações nutricionais em plantações de *Eucalyptus* spp. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. (ed) **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005.

BRONDANI, G. E.; **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

CARMO, A. L. M. **Prospecção de isolados de rizobactérias e filoplano para promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus benthamii.*** 2012. 36f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati. 2012.

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

GAVA, J.L.; GONÇALVES, J.L.M.; SHIBATA, F.Y.; CORRADINI, L. Eficiência relativa de fertilizantes fosfatados no crescimento inicial de eucalipto cultivado em solos do cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, n.3, p.497-504, 1997.

GIRACCA, E. M. N.; NUNES, J. L. da S. **Cálcio (Ca)**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_calcio.aspx> Acesso em 20 jan. 2016.

GONÇALVES, J. L. de M; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. 427p.

IBÁ, **Anuário estatístico IBÁ 2015**: ano base 2014. Brasília: IBÁ, 2015. 64p.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B. & SIQUEIRA, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento de clones de eucalipto. **Revista Árvore**. v.33, p.789-797, 2009.

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

MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1980. 251p.

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1976. 528p.

MOREIRA, A. L. de L**. Bioprospecção de *Bacillus* spp. promotores do crescimento de mudas de eucalipto**. 2012. 50f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2012.

NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F.; LEITE, F.P.; VILLANI, E.M.A.; TEIXEIRA, J.L.; LEAL, P.G.L. Avaliação da eficiência do fosfato de Norte Carolina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995. **Resumos**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995, p.2214-2216.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PRIMAVESI, A., **Manejo ecológico do solo:** agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Editora Nobel, 2002.

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

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

VALERI, S. V.; CORRADINI, L. Fertilização em viveiros para produção de mudas de *Eucalyptus* e *Pinus*. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. (ed) **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005.