

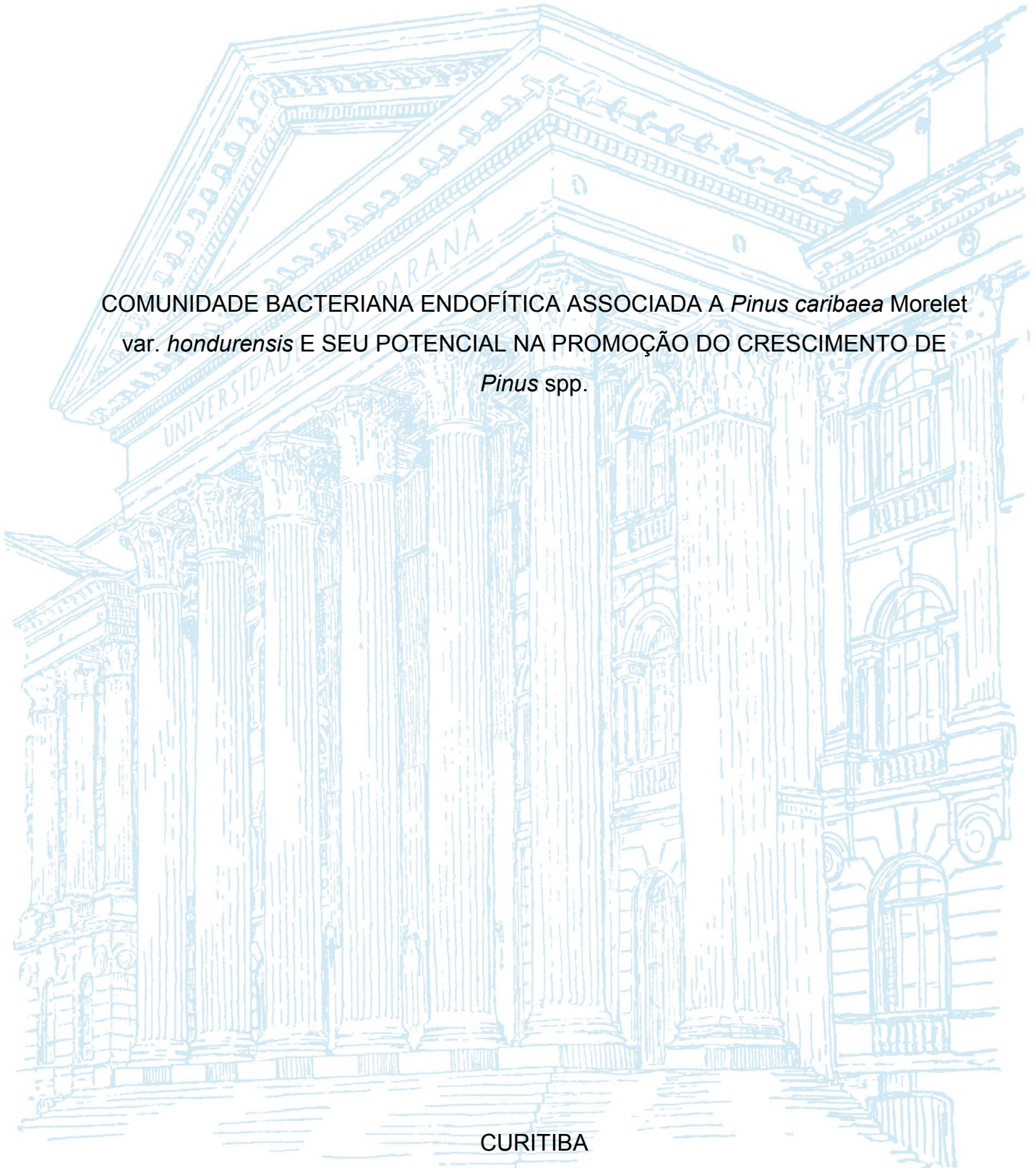
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÁRYAN THARINE SABOYA BALDIN

COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA A *Pinus caribaea* Morelet  
var. *hondurensis* E SEU POTENCIAL NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE  
*Pinus* spp.

CURITIBA

2021



DÁRYAN THARINE SABOYA BALDIN

COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA A *Pinus caribaea* Morelet  
*var. hondurensis* E SEU POTENCIAL NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE  
*Pinus* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Dra. Katia Christina Zuffellato-Ribas

Coorientadora: Dra. Regina Caetano Quisen

Coorientadora: Dra. Krisle da Silva

Coorientador: Dr. Henrique Soares Koehler

Coorientador: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

CURITIBA

2021

Baldin, Dáryan Tharine Saboya

Comunidade bacteriana endofítica associada a *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* e seu potencial na promoção do crescimento de *Pinus* spp. / Dáryan Tharine Saboya Baldin. - Curitiba, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientadora: Katia Christina Zuffellato-Ribas

Coorientadora: Regina Caetano Quisen

Coorientadora: Krisle da Silva

Coorientador: Henrique Soares Koehler

Coorientador: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

1. Azospirillum brasilense. 2. Enraizamento. 3. Germinação. I. Zuffellato-Ribas, Katia Christina. II. Quisen, Regina Caetano. III. Silva, Krisle da. IV. Koehler, Henrique Soares. V. Santos, Bruno Francisco Sant'Anna dos. VI. Título. VII. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DÁRYAN THARINE SABOYA BALDIN** intitulada: **COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA ASSOCIADA A *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E SEU POTENCIAL NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Pinus* spp.**, sob orientação da Profa. Dra. KATIA CHRISTINA ZUFFELLATO-RIBAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica

15/07/2021 15:14:39.0

KATIA CHRISTINA ZUFFELLATO-RIBAS  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/07/2021 15:42:54.0

GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/07/2021 09:32:10.0

SANDRA REGINA CABEL  
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/07/2021 08:45:55.0

JULIANA DEGENHARDT  
Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA  
AGROPECUÁRIA)

---

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5601 - E-mail: [pgapv@ufpr.br](mailto:pgapv@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 101290

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 101290

Aos meus pais, Diane Saboya Pitta e Pedro Baldin Filho,  
por acreditarem sempre no meu potencial,

Dedico,

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me guiar sempre pelo caminho da luz e por, acima de tudo, orientar-me e dar-me forças, paciência, sabedoria e discernimento para entender que a vida é feita por momentos ótimos e outros não tão bons assim, e que, no final, tudo serve como aprendizado!

À minha mãe, Diane Saboya Pitta, pelo incentivo, paciência e amor incondicional. Sem dúvida alguma, ter crescido e tido você como referência fez com que eu buscasse para mim mesma, diariamente, tamanha força, autenticidade e coragem. Espero orgulhar-te cada dia mais.

Ao meu pai, Pedro Baldin Filho, por sempre me proporcionar o melhor e por não me deixar faltar nada. Agradeço por sempre orar por mim, pela minha saúde e meu sucesso. Sou grata por ser sua filha e carregar muito de você em mim!

Ao Henrique Barreto Lopes pela cumplicidade, amizade e parceria durante todos esses anos que compartilhamos juntos. Você alegrou meus dias tristes, arrancou sorrisos frouxos quando meus olhos marejavam e trouxe calma nos momentos de tempestade. Seus gestos e suas palavras de encorajamento me deram forças para ir cada vez além.

À Katia Christina Zuffellato-Ribas por ter me acolhido de coração, cabeça e braços abertos quando a procurei para ser minha orientadora. Sua generosidade com seus orientados faz com que busquemos alcançar a nossa melhor versão, pois você nos instiga a progredir e faz com que crescamos pessoalmente e profissionalmente.

À Regina Caetano Quisen e Krisle da Silva pela oportunidade de ingresso no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e Laboratório de Microbiologia do Solo. As inúmeras orientações e conversas contribuíram imensamente para a concretização desse sonho e, por isso, as agradeço verdadeiramente.

Aos demais professores e co-orientadores pelos ensinamentos divididos durante todos esses meses.

À banca de pré-defesa e defesa pelos direcionamentos e sugestões, os quais enriqueceram grandemente o trabalho.

Aos colegas do Grupo de Estudo e Pesquisa em Estaquia (GEPE), que sempre estiveram presentes, de modo tão solícito, em momentos importantes de estudos, treinamentos, limpezas, diversão e conquistas.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, Laboratório de Microbiologia do Solo e Laboratório de Biologia Molecular, meus sinceros agradecimentos pelas contribuições no ambiente de trabalho.

Aos amigos que a vida me presenteou, os quais torceram por mim, me incentivaram e comemoraram minhas conquistas como se fossem suas.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À Universidade Federal do Paraná e à Embrapa Florestas pela oportunidade concedida.

Cada um de vocês teve um papel primordial no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada.

*“A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência,  
mas pela capacidade de começar de novo.”*  
F. Scott Fitzgerald



## RESUMO

*Pinus* compreende, no território brasileiro, plantios comerciais em aproximadamente 2 milhões de hectares. O grande interesse econômico e comercial agregados às espécies de *Pinus* vêm estimulando a necessidade de serem elaborados e disponibilizados métodos mais rápidos e eficientes para a sua propagação, os quais superem as dificuldades encontradas na clonagem silvicultural e favoreçam uma maior multiplicação dos genótipos de interesse. A propagação vegetativa por miniestaquia e micropropagação, bem como a propagação por sementes de genótipos superiores, têm se mostrado como alternativas promissoras na busca por ganhos em produtividade em plantios de *Pinus*, visando atender às demandas crescentes de mudas de qualidade fisiológica superior. Visando a obtenção de números mais promitentes de mudas clonadas e uma maior sustentabilidade dos plantios, a aplicabilidade de bactérias associativas promotoras de crescimento vegetal otimizam, por meio de vários mecanismos, o potencial de promoção de crescimento de espécies lenhosas florestais. A síntese microbiana de ácido indol-3-acético (IAA) aparece como uma alternativa natural ao uso de reguladores vegetais e, semelhantemente, contribui para um maior desenvolvimento vegetal. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo o isolamento, identificação e avaliação do potencial de bactérias endofíticas isoladas de *Pinus* na promoção de crescimento vegetal, na inoculação e desenvolvimento radicular de sementes e enraizamento de propágulos vegetativos de *Pinus taeda* L. e *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Pela trituração das acículas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, foram isoladas estirpes bacterianas diversas. Após a purificação, foram realizadas análises de caracterização fenotípica, identificação molecular e quantificação da síntese de IAA para os isolados bacterianos. Para os ensaios de germinação, as sementes foram inoculadas com as bactérias endofíticas e as estirpes comerciais *Azospirillum brasilense* 2083 e *Azospirillum brasilense* 2084, com aplicação de peróxido de hidrogênio para superação da dormência tegumentar. Miniestacas de *Pinus taeda* L. foram inoculadas com os isolados bacterianos obtidos e duas estirpes de *Azospirillum brasilense*. Em condições *in vitro*, microestacas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* foram avaliadas perante a inoculação com as bactérias endofíticas. Foram obtidos 39 isolados bacterianos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Onze isolados foram identificados e apresentaram similaridade com os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. As estirpes CNPF 307 e CNPF 317 destacaram-se na biossíntese de IAA em meio com e sem L-triptofano. Os tratamentos com bactérias endofíticas e *Azospirillum brasilense* favoreceram a germinação de sementes de *Pinus taeda* L., aumentaram o índice de velocidade de germinação (IVG), diminuíram o tempo médio de germinação (TMG) e apresentaram mudas mais vigorosas, com raízes mais longas e maior altura das plântulas. Em relação ao enraizamento em casa de vegetação, *A. brasilense* e o isolado CNPF 316 promoveram um incremento no percentual de miniestacas enraizadas de *Pinus taeda* L., número médio de raízes e comprimento médio de raízes. Para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* micropropagado, os isolados CNPF 300 e CNPF 303 favoreceram um maior crescimento aéreo das microestacas. Nenhum isolado bacteriano contribuiu para o enraizamento *in vitro* de microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, bactérias promotoras de crescimento em plantas, dormência tegumentar, enraizamento, germinação.

## ABSTRACT

*Pinus* comprises, in Brazilian territory, commercial plantations in approximately 2 million hectares. The great economic and commercial interest in *Pinus* species has been stimulating the need to develop and make available faster and more efficient methods for propagation, which overcome the difficulties found in clonal silviculture and favor a greater multiplication of interesting genotypes. Vegetative propagation by minicutting and micropropagation, as well as propagation by seeds of superior genotypes, have shown to be promissory alternatives in the search for productivity gains in *Pinus* plantations, seeking to attend the growing demand of superior physiological quality seedlings. Aiming to obtain more promising numbers of cloned seedlings and greater sustainability of plantations, the applicability of associative and growth-promoting bacteria optimizes, through various mechanisms, the growth promotion potential of woody forest species. Microbial synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) appears as a natural alternative to the use of chemical plant regulators and, similarly, contributes to a greater plant development. Therefore, the present study aimed to isolate, identify and evaluate the potencial of endophytic bacteria isolated from *Pinus* in promoting plant growth by inoculation and root development of seeds and rooting of vegetative propagules of *Pinus taeda* L. and *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. By crushing the *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* aciculates leaves, several bacterial strains were isolated. After purification, phenotypic characterization, molecular identification and quantification of IAA synthesis were performed for the endophytic bacterial isolates. For the germination experiments, the seeds were inoculated with the endophytic bacteria and commercial strains of *Azospirillum brasilense* 2083 and *Azospirillum brasilense* 2084, with application of hydrogen peroxide to overcome the tegumentary dormancy. *Pinus taeda* L. minicuttings were inoculated with the bacterial isolates and both strains of *Azospirillum brasilense*. Under *in vitro* conditions, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* microcuttings were evaluated after endophytic bacterial inoculation. 39 bacterial isolates were obtained of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Eleven isolates were identified and showed similarity with *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Staphylococcus* genus. The strains CNPF 307 and CNPF 317 stood out in IAA biosynthesis in growth medium with or without L-tryptophan. The treatments with endophytic bacteria and *Azospirillum brasilense* favored the germination of *Pinus taeda* L. seeds, increased germination speed index (GSI), decreased the average germination time (AGT) and obtained more vigorous seedlings, with longer roots and higher seedlings height. About rooting in greenhouse, *Azospirillum brasilense* and CNPF 316 promoted an increment in rooted *Pinus taeda* L. minicuttings percentage, average number of roots and average root length. For micropropagated *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, the isolates CNPF 300 and CNPF 303 furthered aerial plant growth of microcuttings. No endophytic bacterial isolate contributed to *P. caribaea* var. *hondurensis* *in vitro* rooting.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, plant growth-promoting bacteria, tegumentary dormancy, rooting, germination.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – PROCESSO DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021..... 42
- FIGURA 2** – ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Acinetobacter* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 297, CNPF 305, CNPF 317 E CNPF 321 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021..... 50
- FIGURA 3** – ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Pseudomonas* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 303, CNPF 307 E CNPF 311 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021..... 51
- FIGURA 4** – ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Sphingomonas* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 304 E CNPF 312 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021..... 52
- FIGURA 5** – ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Staphylococcus* E DO ISOLADO BACTERIANO CNPF 300 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021..... 53
- FIGURA 6** – TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM DUAS

	ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021.....	83
<b>FIGURA 7 –</b>	CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM DUAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. ....	84
<b>FIGURA 8 –</b>	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021.....	88
<b>FIGURA 9 –</b>	CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. ....	89
<b>FIGURA 10 –</b>	SEMENTES GERMINADAS DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. ....	92
<b>FIGURA 11 –</b>	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 11 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i>	

Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021..... 94

**FIGURA 12** – CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 95

**FIGURA 13** – MINIESTACAS ENRAIZADAS DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A APLICAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (IBA) E DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 115

**FIGURA 14** – MINIESTACAS ENRAIZADAS DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 123

**FIGURA 15** – BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* COM EXPRESSÃO DE COLÔNIAS BACTERIANAS NO MEIO DE CULTURA. Curitiba, PR, abril de 2021..... 126

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 47
- TABELA 2** – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA) SINTETIZADO PELAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, *Azospirillum brasilense* 2083 e *Azospirillum brasilense* 2084 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO (100 mg L<sup>-1</sup>). Curitiba, PR, abril de 2021..... 58
- TABELA 3** – SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER), COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Curitiba, PR, abril de 2021. .... 85
- TABELA 4** – SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER), COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Pinus taeda* L INOCULADAS COM 38 ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Curitiba, PR, abril de 2021. .... 91
- TABELA 5** – SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER) E COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM 11 ESTIRPES SELECIONADAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS

	DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). Curitiba, PR, abril de 2021.....	96
<b>TABELA 6 –</b>	MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (IBA) E DUAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> . Curitiba, PR, abril de 2021.....	113
<b>TABELA 7 –</b>	MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) DE <i>Pinus taeda</i> L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> . Curitiba, PR, abril de 2021.....	121
<b>TABELA 8 –</b>	MICROESTACAS ENRAIZADAS (%MIE), MICROESTACAS VIVAS (%MIV) E MORTAS (%MIM), MICROESTACAS COM CONTAMINAÇÃO VISÍVEL NO MEIO DE CULTURA (%MICV), NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR MICROESTACA (NBMI) E ALTURA MÉDIA DAS MICROESTACAS (ALTM) DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM DIFERENTES INÓCULOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS. Curitiba, PR, abril de 2021.....	124

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1** – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A SÍNTESE DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA) PELAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. *Azospirillum brasilense* 2083 E *Azospirillum brasilense* 2084 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO (100 mg L<sup>-1</sup>). Curitiba, PR, abril de 2021..... 147
- ANEXO 2** – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* 2083, *Azospirillum brasilense* 2084 E TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 147
- ANEXO 3** – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM 38 ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. .... 148
- ANEXO 4** – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L.



	INOCULADAS COM 11 ESTIRPES SELECIONADAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021. ....	148
<b>ANEXO 5 –</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM DUAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> E TRÊS CONCETRAÇÕES DE IBA. Curitiba, PR, abril de 2021. ....	149
<b>ANEXO 6 –</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> . Curitiba, PR, abril de 2021. ....	149
<b>ANEXO 7 –</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MICROESTACAS ENRAIZADAS (%MIE), MICROESTACAS VIVAS (%MIV) E MORTAS (%MIM), MICROESTACAS CONTAMINADAS (%MIC), NÚMERO DE BROTOS POR MICROESTACA (NBMI) E ALTURA MÉDIA DAS MICROESTACAS (ALTM) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> . Curitiba, PR, abril de 2021. ....	150

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 GÊNERO <i>Pinus</i> .....	18
2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES .....	19
2.2.1 <i>Pinus taeda</i> L. ....	19
2.2.2 <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> .....	20
2.3 PROPAGAÇÃO SEXUADA.....	21
2.4 PROPAGAÇÃO ASSEXUADA.....	22
2.4.1 Estaquia e miniestaquia .....	23
2.4.2 Micropropagação.....	25
2.5 ENRAIZAMENTO .....	26
2.5.1 Fatores internos .....	28
2.5.2 Fatores externos .....	30
2.5.3 Reguladores vegetais.....	31
2.6 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	32
2.6.1 Síntese de auxinas por bactérias promotoras de crescimento em plantas 34	
<b>3 CAPÍTULO I: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A PARTIR DE TECIDOS VEGETAIS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>36</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>37</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
3.2.1 Isolamento, purificação e caracterização fenotípica.....	41
3.2.2 Análises moleculares e filogenéticas.....	42
3.2.3 Síntese de ácido indol-3-acético por bactérias endofíticas.....	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.3.1 Isolamento, purificação e caracterização fenotípica.....	46
3.3.2 Análises moleculares e filogenéticas.....	48
3.3.3 Síntese de ácido Indol-3-acético por bactérias endofíticas .....	56

3.4 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS .....	64
<b>4 CAPÍTULO II: GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> L. IN VITRO COM A APLICAÇÃO DE INOCULANTES MICROBIANOS.....</b>	<b>71</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>72</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	73
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	76
4.2.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> .....	76
4.2.2 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com 38 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> .....	78
4.2.3 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com 11 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> .....	79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.3.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> .....	82
4.3.2 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com 38 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> .....	86
4.3.3 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com 11 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> .....	93
CONCLUSÕES .....	98
REFERÊNCIAS .....	99
<b>5 CAPÍTULO III: ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE <i>Pinus taeda</i> L. E DE MICROESTACAS DE <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> IN VITRO POR MEIO DE INOCULANTES MICROBIANOS.....</b>	<b>103</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>103</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>104</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	105
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	107

5.2.1 Miniestaquia de <i>Pinus taeda</i> L. com inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	107
5.2.2 Miniestaquia de <i>Pinus taeda</i> L. com inoculação de bactérias endofíticas.....	109
5.2.3 Microestaquia de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> com inoculação de bactérias endofíticas .....	110
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
5.3.1 Miniestaquia de <i>Pinus taeda</i> L. com inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	113
5.3.2 Miniestaquia de <i>Pinus taeda</i> L. com inoculação de bactérias endofíticas.....	119
5.3.3 Microestaquia de <i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> com inoculação de bactérias endofíticas .....	124
5.4 CONCLUSÕES .....	129
REFERÊNCIAS.....	130
<b>6 CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>135</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>137</b>
REFERÊNCIAS.....	139
<b>ANEXOS .....</b>	<b>147</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Para o desenvolvimento de práticas cada vez mais sustentáveis e que garantam maior produtividade na silvicultura, são requeridas estratégias que visem ao aumento da produção sem que ocorram detrimientos ao meio ambiente e à saúde, mas também se enquadrem no contexto econômico, social e político de cada localidade. Em vista disso, a aplicação de biofertilizantes compostos por microrganismos promotores de crescimento em plantas emerge como uma das alternativas potenciais para incrementar a sustentabilidade e, conseqüentemente, a produtividade dos plantios (Santos e Varavallo, 2011; Mariosa et al., 2017; Ribeiro e Pamphile, 2017).

O interesse na aplicabilidade desses microrganismos em práticas silviculturais expandiu-se consideravelmente nos últimos anos, pois além de serem substitutos potenciais de produtos químicos, atuam beneficiando, através de relações simbióticas, o crescimento vegetal e o controle biológico de inúmeras doenças (Lacava et al., 2006; Santos e Varavallo, 2011). Os ganhos em crescimento e desenvolvimento, como o aumento da área foliar e do sistema radicular, ocorrem devido à capacidade de síntese de reguladores vegetais que a grande maioria desses microrganismos apresentam. A auxina ácido indol-3-acético (IAA), no entanto, é o principal regulador vegetal envolvido na associação planta/microrganismos promotores de crescimento. O IAA encontra-se envolvido em inúmeros e complexos processos fisiológicos, relacionados com a alongação, divisão e diferenciação celular (Aloni et al., 2006; Tsavkelova et al., 2006; Santoyo et al., 2016; Duarte et al., 2020).

As bactérias encontram-se entre os principais microrganismos associados às plantas, colonizando-as epifítica ou superficialmente a órgãos ou internamente aos tecidos vegetais, respectivamente (Sakiyama, 2001; Assumpção, 2008). Como dito, as bactérias endofíticas vivem durante todo ou parte do seu ciclo de vida dentro dos tecidos vegetais, sem causar malefícios às plantas. Essas bactérias constituem o microbioma e estabelecem relações mutualísticas com seus hospedeiros, beneficiando-os de inúmeras maneiras, principalmente otimizando o seu potencial de promoção de crescimento (Orlikowska et al., 2017; Hernández-Soberano et al., 2020).

Perante isso, a produção de mudas florestais de genótipos superiores em quantidade e com alta qualidade agregada é um dos pontos mais determinantes para o estabelecimento de plantios florestais, refletindo significativamente na maior

produtividade dos mesmos. As mudas, idealmente, devem possuir sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos, condições nutricionais adequadas, ausência de pragas e doenças, altas taxas de sobrevivência e desenvolvimento após o plantio (Brunetta et al., 2010; Prado, 2014). Para a obtenção de mudas de alta qualidade e em grande quantidade, técnicas de propagação vegetativa, como a miniestaquia e a propagação *in vitro*, são aplicadas constantemente em processos de melhoramento genético vegetal de empresas silviculturais (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012). Essas técnicas surgem como uma alternativa eficaz à superação das dificuldades encontradas na propagação sexuada ou seminal, como a baixa uniformidade dos plantios e menor controle genético do material vegetal propagado. Apesar das dificuldades, a propagação por sementes ocorre em maior proporção em relação aos métodos assexuados, uma vez que a clonagem de *Pinus* apresenta problemáticas particulares, como as baixas taxas de enraizamento dos propágulos vegetativos e dificuldade de rejuvenescimento das plantas matrizes (Dias et al., 2012).

A aplicação de algumas substâncias exógenas, como a auxina ácido indol-3-butírico (IBA) e inoculantes microbianos, associadas às técnicas de propagação vegetativa, favorece o crescimento e o desenvolvimento de algumas espécies vegetais. Embora os estudos sobre a aplicação de bactérias promotoras de crescimento na propagação vegetativa sejam escassos, o seu uso aparece como uma alternativa natural ao uso de reguladores vegetais e deveras promissora à agricultura (Sakiyama, 2001).

Nesse contexto, os objetivos do estudo foram: isolar e caracterizar estirpes de bactérias endofíticas de material vegetativo de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*; avaliar o potencial germinativo *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. com a aplicação de inoculantes bacterianos de *Azospirillum brasilense* e bactérias endofíticas; e, avaliar as respostas rizogênicas e desenvolvimento inicial de miniestacas de *Pinus taeda* L. e segmentos nodais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* perante a inoculação com *Azospirillum brasilense* e bactérias endofíticas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *Pinus*

O Brasil possui a segunda maior cobertura florestal do mundo, com aproximadamente 530 milhões de hectares, dos quais 9 milhões são florestas plantadas com *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., respectivamente, 23% e 77% desse total (IBÁ, 2020). Atualmente, a área plantada de *Pinus* no Brasil é de aproximadamente 2 milhões de hectares, obtendo uma produtividade média de 31,3 m<sup>3</sup>/ha/ano (IBÁ, 2020). Cerca de 87% da área cultivada dessa conífera no Brasil concentra-se nas regiões Sul e Sudeste do país, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento desse gênero, como o Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais (Pinto Júnior et al., 2013; Miranda, 2015; IBÁ, 2020).

O gênero *Pinus* pertence ao reino Plantae, divisão Pinophyta, classe Pinopsida, ordem Coniferae, família Pinaceae e grupo das Gymnospermae (Aroni 2005; Miranda, 2015). É constituído por 112 espécies e, dependendo da taxonomia, pode ser dividido em dois ou mais subgêneros, sendo os mais conhecidos: *Pinus*, com a maioria das espécies; e *Strobilus* (Ferreira, 2009). Geneticamente, possui cerca de 13 milhões de genes e 12 pares de cromossomos (Bertolini, 2011).

Tal gênero é constituído por plantas de caráter lenhoso, em geral arbóreas, de altura que varia de 3 a 50 metros e que apresentam crescimento rápido (Morais et al., 2005). O tronco constitui a parte mais importante da planta, uma vez que há um grande interesse econômico em torno dele (Morais et al., 2005). A madeira apresenta, em geral, coloração clara, com cerne e albúrnio indistintos pela cor, variando do amarelo-claro ao alaranjado ou castanho-avermelhado (Morais et al., 2005; Bertolini, 2011). Devido a sua grande versatilidade, rusticidade e adaptabilidade, juntamente com o seu excelente ritmo de crescimento e qualidade da madeira, o cultivo de *Pinus* tem recebido grande destaque comercial e econômico tanto no Brasil como no mundo (Georgin, 2014).

Dentre as espécies mais cultivadas no Brasil estão: *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*, as quais foram introduzidas no território brasileiro por meio de sementes importadas do norte da América. Espécies de pinus tropicais também são cultivadas no território brasileiro, embora em menor escala, como *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*,

*Pinus maximinoi*, *Pinus patula* e *Pinus tecunumanii* (Shimizu, 2008; Bertolini, 2011; Santos, 2015).

A grande variedade de espécies introduzidas no Brasil possibilita o plantio deste gênero em todo o território brasileiro, sendo distribuídas conforme as restrições climáticas de cada espécie. Do mesmo modo que para outras espécies florestais, o clima é fator limitante e condicionante do cultivo das coníferas do gênero *Pinus* (Shimizu, 2008; Aguiar et al., 2011). Tais pinheiros ocupam ambientes com condições adversas e restritivas, como áreas marginais com temperaturas mais baixas, latitudes elevadas e solos pobres ou ácidos (Bechara, 2003; Zanchetta e Pinheiro, 2007). Os solos e as condições climáticas no Brasil são extremamente favoráveis para a formação de suas florestas, fato que é observado pela produtividade superior às obtidas em países como Rússia, Canadá, Escandinávia e outras regiões tradicionalmente produtoras de coníferas (Carreira e Dias, 2005). É importante ressaltar que o aumento na disponibilidade da madeira ocasiona, a cada ano, um aumento no plantio de espécies florestais de interesse econômico, principalmente em virtude da utilização de novas tecnologias silviculturais e crescentes investimentos em pesquisas de melhoramento genético (Bertolini, 2011).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES

### 2.2.1 *Pinus taeda* L.

*Pinus taeda* L., popularmente conhecido como pinheiro-amarelo, pinheiro rabo de raposa, pinheiro do banhado, pinheiro americano ou “loblolly pine”, é uma espécie de conífera oriunda das planícies adjacentes ao Golfo do México e Costa Atlântica dos Estados Unidos (Marchiori, 2005). Sua introdução no Brasil ocorreu em meados dos anos 50, devido à Lei do Incentivo Fiscal e consequente importação de coníferas exóticas dos Estados Unidos da América pelo atual Instituto Florestal do Estado de São Paulo (Shimizu, 2008). Desse modo, a espécie foi disseminada, inicialmente, para os estados do Sul e Sudeste do Brasil e, posteriormente, para o restante do país em menores proporções. O estado do Paraná abrange 44% dos plantios, seguido de Santa Catarina (26%), Rio Grande do Sul (17%) e São Paulo (9%) (IBÁ, 2020). Segundo dados do ABRAF (2013), os plantios de *Pinus taeda* L. representam 90% de todas as florestas do gênero encontradas em território brasileiro.



É uma árvore ideal para a restauração de solos e manejo florestal, sendo a conífera mais resistente e versátil, devido a sua alta capacidade de reprodução e facilidade de crescimento. É uma espécie que germina com facilidade, regenera-se facilmente, fornece grandes rendimentos por hectare e muitos produtos comercializáveis diferentes, abrangendo indústrias de celulose e papel, painéis de madeiras e laminados, carvão vegetal, produtos sólidos madeireiros, tecidos sintéticos (têxtil) e produção de resina (Shimizu, 2008; IBÁ, 2020).

Em relação à morfologia, suas árvores apresentam tronco com casca marrom avermelhado, fascículos contendo três acículas finas, com margens delicadamente dentadas, de coloração verde azulado e com tamanho entre 15 e 20 centímetros. É uma espécie heliófila e de rápido crescimento, podendo alcançar mais de 20 metros de altura e até 100 cm de diâmetro (Golle, 2007; Aguiar et al., 2011).

### **2.2.2 *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis***

Após uma série de estudos genéticos, morfológicos e ecológicos da espécie *Pinus caribaea*, constatou-se que a mesma compreende três variedades: *bahamensis*, *caribaea* e *hondurensis*. Todas as variedades de *Pinus caribaea* apresentam potencial significativo a plantios florestais em zonas quentes e livres de geada, sendo denominados como espécies tropicais (Bila, 2010; Trianoski, 2012). Dentre os *Pinus* tropicais, *Pinus caribaea* é a espécie mais relevante, visto que apresenta boa adaptação em solos pobres e em regiões com déficit hídrico, rápido crescimento, boa forma do fuste e facilidade de obtenção de sementes (Freitas et al, 2005; Bila, 2010).

É uma espécie originária da América Central e do Caribe e que ocorre naturalmente nas terras baixas de Belize, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Cuba, Bahamas e no leste do México (Neto e Duboc, 2008; Almeida, 2011; Trianoski, 2012). As árvores de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* podem alcançar uma altura de aproximadamente 45 metros e diâmetro de base caulinar acima de 1 metro, com tronco reto, bem formado e sem muitas ramificações, o que aumenta o valor agregado à sua madeira. Essa espécie apresenta como característica marcante a presença de *fox-tail* (cauda de raposa) em sua copa, a qual está sob controle genético e pode ser reduzida por meio de seleção (Shimizu, 2008; Ferreira, 2009; Trianoski, 2012; Santana e Imaña-Encinas, 2013).

O sucesso comercial dessa espécie ocorre em virtude da disponibilidade de sementes e ao seu bom desenvolvimento em solos pobres, além da qualidade superior de sua madeira, denominada como *softwood* (madeira mole), e elevada produção de resina, atraindo visões econômicas (Freitas et al., 2005; Bila, 2010; Santos, 2015). Seu interesse econômico abrange áreas como indústria de celulose e papel, laminados e madeiras sólidas, lenha industrial e carvão vegetal (Shimizu, 2008; Ferreira, 2009; Trianoski, 2012).

### 2.3 PROPAGAÇÃO SEXUADA

A grande maioria dos estudos referentes à propagação de espécies florestais exóticas plantadas em território brasileiro, dentre elas *Pinus* sp., está relacionada ao método de propagação sexuada, principalmente devido ao maior domínio operacional e aos menores preços iniciais das técnicas utilizadas (Dias et al., 2012).

O uso da propagação por sementes tem sido limitado à produção comercial de mudas, uma vez que as sementes de algumas espécies normalmente são recalcitrantes e apresentam produção baixa e irregular ao longo dos anos, fato que dificulta o suprimento pertinente no processo de produção de mudas. Dentre essas limitações, a dificuldade na definição da época ideal de colheita das sementes, bem como do ponto de maturidade do fruto compatível com a maturidade da semente, são fatores que também contribuem para o insucesso da propagação por sementes (Dias et al., 2012).

Aliada à estas limitações, tem-se, ainda, a heterogeneidade nos plantios, a qual pode resultar em aumentos consideráveis dos custos operacionais com tratamentos silviculturais e gerar mudas desuniformes e sujeitas à baixa qualidade em virtude da grande variação genotípica, o que pode ser desfavorável à produtividade (Andrejow e Higa, 2009; Dias et al., 2012, Miranda, 2015).

No caso do gênero *Pinus* sp., embora as limitações da reprodução sexuada afetem a produção de mudas e, conseqüentemente, atuem na diminuição da produtividade dos plantios, a utilização de sementes tem sido amplamente recomendada em razão da dificuldade de obtenção do rejuvenescimento de material adulto (Andrejow e Higa, 2009). Assim sendo, para a produção de mudas desse gênero, as sementes devem apresentar elevada qualidade fisiológica e sanitária, proporcionando uma germinação rápida e uniforme (Carmo, 2017).

## 2.4 PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

A propagação vegetativa, também conhecida como reprodução assexuada, consiste na produção de mudas a partir da utilização de partes ou órgãos das plantas, como raízes e caules, de forma a originar organismos geneticamente idênticos à planta mãe (Wendling et al., 2006; Miranda, 2015; Santos, 2015). O plantio de mudas vegetativamente propagadas apresenta como principal vantagem a formação de plantios clonais de alta produtividade e uniformidade, com maiores ganhos genéticos do que na reprodução por semente, uma vez que todas as características de interesse de um determinado indivíduo são repassadas às plantas subsequentes (Wendling et al., 2006; Miranda, 2015). Além disso, tais plantios florestais melhorados por meio da clonagem apresentam ganhos na qualidade da madeira e de seus produtos, assim como resistência à pragas e doenças, resultando na obtenção de árvores geneticamente superiores (Wendling, 2003; Santos, 2015).

Tal ferramenta apresenta suma importância dentro da cadeia do melhoramento genético vegetal, uma vez que maximiza os ganhos genéticos em uma única geração, mantendo as características de interesse das plantas e evitando quaisquer alterações na variabilidade genética (Oliveira, 2010; Miranda, 2015). A partir do uso da propagação vegetativa em espécies de *Pinus* é possível promover o rejuvenescimento fisiológico dessas plantas, resgatar germoplasma de interesse e multiplicar genótipos de valor superior (Miranda, 2015).

A propagação vegetativa de genótipos superiores de espécies florestais tem sido uma ferramenta notável nos programas de melhoramento genético e pode ser realizada a partir de várias técnicas, dentre as quais destacam-se a estaquia, miniestaquia, enxertia, alporquia, mergulhia e técnicas de micropropagação (Aguiar et al., 2011; Antonelli, 2013; Miranda, 2015; Santos, 2015). A escolha dessas técnicas varia, principalmente, de acordo com o objetivo, a espécie envolvida, a época do ano, a habilidade do executor do método, o tipo e a quantidade de material vegetal disponível, as condições ambientais e a disponibilidade de recursos físicos, financeiros e humanos (Quadros, 2009; Miranda, 2015). Dentre as técnicas citadas, a estaquia e suas derivações compreendem a via mais viável economicamente da propagação vegetativa (Dias et al., 2012).

### 2.4.1 Estaquia e miniestaquia

A propagação vegetativa via estaquia de espécies florestais com significativa importância comercial, como eucalipto e pinus, constitui um importante papel em programas de melhoramento genético, pois atua no aumento da produção e na manutenção da uniformidade do material genético, gerando plantios homogêneos e com maior produtividade (Alcântara et al., 2008; Santos e Varavallo, 2011; Antonelli, 2013). O método baseia-se na formação de raízes nas estacas obtidas, sendo um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e rediferenciação de células adultas e já diferenciadas, ativando células totipotentes na regeneração de suas partes faltantes, originando assim raízes adventícias (Quadros, 2009; Dias et al., 2012). As raízes são assim denominadas por não serem originárias de embriões, mas sim da região basal de caules, onde um grupo de células vegetais, localizadas entre os feixes vasculares, desdiferenciam-se em células meristemáticas, auxiliando na multiplicação celular (Quadros, 2009).

As estacas podem ser obtidas a partir de raízes, caules, ramos, folhas e até mesmo de fascículos, no caso de *Pinus* sp., e devem ser submetidas a condições que favoreçam o seu enraizamento e desenvolvimento, a fim de gerar uma nova planta geneticamente igual ao indivíduo de procedência (Wendling, 2003; Miranda, 2015; Rivera-Rodriguez et al., 2016). A viabilidade da propagação comercial por estaquia e miniestaquia depende diretamente da capacidade de enraizamento de cada espécie, assim como da qualidade do sistema radicial formado e do posterior desenvolvimento da planta (Dias et al., 2012). O processo de formação de raízes nas estacas pode ser influenciado por uma série de fatores, sendo estes intrínsecos, relacionados à própria planta, ou extrínsecos, ligados às condições ambientais (Dias et al., 2012).

A técnica de estaquia apresenta diversas vantagens em relação a outros métodos de propagação vegetativa, como rapidez, simplicidade, baixo custo, ausência de incompatibilidade, grande uniformidade de mudas e maior número de mudas obtidas por planta matriz (Quadros, 2009).

Como a propagação vegetativa tem sido amplamente adotada no cenário da silvicultura, torna-se necessário um aperfeiçoamento dos métodos existentes, uma vez que algumas espécies não respondem à técnica como esperado (Andrejow, 2006). Assim sendo, a técnica de estaquia sofreu modificações que proporcionaram o aumento da qualidade das mudas produzidas e minimizaram algumas dificuldades no

processo de produção de mudas de certos clones e espécies, principalmente em relação ao enraizamento e tempo para formação das mudas, originando a miniestaquia e microestaquia (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012; Miranda, 2015).

O método de miniestaquia consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método de estaquia padrão como fontes de propágulos vegetativos, apresentando maior grau de rejuvenescimento dos tecidos vegetais e maiores chances de sucesso no enraizamento (Wendling et al., 2006). Esquemáticamente, a técnica fundamenta-se na coleta das brotações recentes de uma estaca enraizada e bem desenvolvida, denominada como minicepa, e preparo das miniestacas, que possuem de 3 a 6 centímetros de comprimento, com corte bisel na base e reto no ápice, podendo ou não conter folhas. Essas miniestacas são submetidas ao enraizamento por um período de tempo determinado e com condições ambientais controladas (Andrejow, 2006; Wendling et al., 2006).

As vantagens da introdução da miniestaquia no cultivo de espécies florestais está relacionada, principalmente, à redução da área produtiva pelo uso de minijardins clonais, à diminuição do intervalo de enraizamento e aclimatização e à redução no uso de reguladores vegetais para a indução do enraizamento (Santos, 2015). Além disso, apresenta uma série de benefícios operacionais, como um maior grau de juvenildade obtida nas miniestacas, o que proporciona um aumento da taxa de iniciação e crescimento radicial, bem como sua maior qualidade e maior redução de custos realizados durante a implantação da técnica (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012).

No entanto, embora apresente uma série de vantagens, a propagação vegetativa de espécies florestais por estaquia ou miniestaquia tem sido limitada por uma série de motivos, como a falta de métodos de rejuvenescimento de material adulto, técnicas inadequadas de manejo do ambiente de propagação, falta de cuidados quanto aos aspectos nutricionais e hídricos das miniestacas e minicepas, ausência de cronogramas de produção bem elaborados e de mão-de-obra qualificada e, principalmente, a escassez de estudos enfatizando fatores relevantes ao enraizamento, os quais envolvem reguladores vegetais, tipos de estacas e miniestacas utilizadas, propriedades do substrato de enraizamento e o desenvolvimento da muda produzida (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012).

Nos dias atuais, a miniestaquia constitui-se como o principal método propagativo adotado nos viveiros florestais brasileiros, utilizada para contornar a

dificuldade de enraizamento de estacas, e aparece como uma ferramenta bastante promissora na implantação de reflorestamentos de *Pinus* spp. (Alcantara et al., 2008; Dias et al., 2012). Além disso, a miniestaquia, quando empregada em espécies lenhosas, propicia um melhor desenvolvimento do sistema radicial em termos de vigor, uniformidade e volume, o que reflete positivamente na sobrevivência e no desenvolvimento do clone em campo e, conseqüentemente, na redução de custos (Alcantara et al., 2008; Santos, 2015).

#### **2.4.2 Micropropagação**

A micropropagação, também denominada como propagação vegetativa *in vitro*, é uma das aplicações da cultura de tecidos mais amplamente utilizadas e consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo adequado, em um ambiente asséptico e com controle de luminosidade, fotoperíodo, temperatura e umidade (Titon, 2001; Oliveira, 2003; Hernández-Soberano et al., 2020). Embora seja uma técnica cara e com custo operacional elevado, na qual se faz necessária mão-de-obra qualificada, apresenta inúmeras vantagens e redução dos custos a longo prazo (Titon et al., 2003; Oliveira et al., 2013).

Na área florestal, a micropropagação vem sendo realizada principalmente por meio da proliferação de gemas axilares obtidas de explantes juvenis ou maduros, organogênese a partir de cotilédones e embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos (Oliveira, 2011; Oliveira et al., 2013; Miranda, 2015).

Na organogênese, após a seleção do material vegetal, assepsia e estabelecimento *in vitro*, com o cultivo dos explantes em meio nutritivo, segue-se a multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos, resultando em múltiplas brotações, fonte de explantes para a última etapa *in vitro*, o enraizamento adventício. Nesta fase, são utilizados como explantes segmentos de hipocótilo, brotações apicais ou intermediárias (segmentos nodais), que devem ser individualizados e transferidos para meio de promoção de alongamento e enraizamento adventício. As plântulas com sistema radicial vigoroso formadas, neste momento estão aptas para subsequente aclimatização *ex vitro* em ambiente de casa de vegetação, com controle rígido de umidade e temperatura (Titon, 2001; Wendling, 2003).

A propagação *in vitro* é uma ferramenta de grande notoriedade na propagação comercial de plantas, permitindo a obtenção de grande número de plantas sadias e

geneticamente uniformes, em curto espaço de tempo e ocupando uma área reduzida de laboratório. Atualmente, a técnica é destinada sobretudo àquelas espécies que apresentam dificuldade de propagação pelos métodos convencionais, principalmente no que diz respeito ao rejuvenescimento, favorecendo espécies de caráter lenhoso e com baixas taxas de enraizamento (Wendling, 2003; Oliveira et al., 2013; Hernández-Soberano et al., 2020). Além disso, os métodos em questão contribuem significativamente para a produção comercial de espécies de elevado interesse econômico, já que a multiplicação dessas plantas ocorre em larga escala e em tempo reduzido (Oliveira et al., 2013).

No contexto de um programa de melhoramento genético de espécies florestais, tem sido empregada de modo crescente a técnica de microestaquia, a qual é considerada estratégica por aliar a qualidade da muda à redução dos custos de produção, além de evitar a disseminação de doenças sistêmicas para as novas plantas micropropagadas (Santos et al., 2005; Mafia et al., 2012).

A microestaquia é uma técnica de propagação vegetal que consiste no enraizamento de propágulos vegetativos rejuvenescidos por meio de micropropagação, visando a obtenção de mudas em escala comercial e principalmente a formação de jardins microclonais (Oliveira, 2003; Wendling, 2003). O emprego dessa técnica tem proporcionado melhorias bastante significativas em plantios de mudas comerciais, como a redução do tempo de formação da muda, o incremento da produtividade, aumento da uniformidade das plantas e a possibilidade de limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio do cultivo de meristemas e superando problemas de contaminação patogênica (Titon et al., 2003; Oliveira et al., 2013). A microestaquia ainda tem contribuído positivamente para o rejuvenescimento dos propágulos vegetativos, o que afeta diretamente na capacidade de enraizamento das estacas e na qualidade do sistema radicial, gerando mudas geneticamente superiores (Titon, 2001; Titon et al., 2003).

## 2.5 ENRAIZAMENTO

A formação de raízes em materiais vegetais propagados vegetativamente é um processo anatômico e fisiológico bastante complexo, uma vez que está associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes. Através da competência adquirida, são formadas novas regiões

meristemáticas e um novo sistema radicial adventício (Andrejow, 2006; Goulart et al., 2014; Miranda, 2015).

Para Hartmann et al. (2002) e Latoh (2019), o processo rizogênico, de modo geral e desconsiderando particularidades intrínsecas de cada espécie, pode ser descrito em seis etapas:

1ª. Aquisição de competência – a planta adquire potencial para o seu desenvolvimento futuro;

2ª. Indução – desenvolvimento de processos moleculares, bioquímicos e anatômicos;

3ª. Desdiferenciação – as células totipotentes já diferenciadas retomam à forma meristemática;

4ª. Determinação – direcionamento de um processo fisiológico e anatômico a um grupo de células específico;

5ª. Diferenciação – alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do estado meristemático para o estado diferenciado;

6ª. Regeneração – formação de um novo tecido vegetal.

A formação das raízes adventícias pode ocorrer de modo direto ou indireto, variando de acordo com as concentrações endógenas de auxinas, promotoras da divisão celular, e citocininas, responsáveis pela diferenciação celular (Goulart et al., 2014; Latoh, 2019). A rizogênese direta consiste no desenvolvimento de raízes adventícias a partir de tecidos específicos, como parênquima e câmbio vascular, e crescimento das mesmas de modo normalizado, garantindo a sustentação e absorção de nutrientes à planta. A rizogênese indireta caracteriza-se pela formação de um tecido proliferativo composto por células indiferenciadas, desorganizadas e em diferentes graus de lignificação, denominado como calos. Os calos podem conter células com centros ativos de divisão celular, possibilitando a sua diferenciação e formação de um novo sistema radicial (Goulart et al., 2014; Pereira e Peres, 2016; Latoh, 2019).

O processo de formação de raízes adventícias, isto é, raízes não oriundas do embrião, mas sim a partir de caules, folhas ou até mesmo de raízes já existentes, é altamente influenciável e controlado por um conjunto de fatores endógenos e exógenos. Dentre os endógenos, citam-se a idade ontogenética, genótipo e as relações hormonais, nutricionais, hídricas e fisiológicas internas. Exogenamente, têm-se os fatores: substratos para enraizamento, aplicação de reguladores vegetais, tipo



das estacas/miniestacas, época de coleta, luminosidade, nutrição mineral, manejo fitossanitário, umidade e temperatura. Juntamente, o entendimento de tais fatores facilita e beneficia o processo de enraizamento de propágulos vegetais (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012; Antonelli, 2013; Miranda, 2015; Pereira e Peres, 2016).

### **2.5.1 Fatores internos**

O estado fisiológico da planta diz respeito ao conjunto de atributos internos da mesma, os quais estão presentes ou não no momento da coleta do material vegetal. Essas condições fisiológicas, em somatório com as condições hídricas e nutricionais, se fazem determinantes no processo de enraizamento, pois ditam a condição dos propágulos vegetativos e das plantas matrizes das quais os propágulos são retirados. Além disso, controlam processos fundamentais no ciclo da planta, como o transporte de seiva via floema e xilema, transporte de nutrientes entre diferentes órgãos vegetais, crescimento e desenvolvimento celular, síntese de fotoassimilados, transporte de hormônios vegetais e outros metabólitos fundamentalmente necessários para a iniciação e desenvolvimento radicial. Se as condições não forem adequadas, a taxa de enraizamento tende a diminuir. Desse modo, as condições hídricas, nutricionais e fisiológicas devem estar balanceadas para que o processo de enraizamento adventício seja otimizado (Andrejow, 2006; Antonelli, 2013).

A capacidade de um propágulo vegetativo formar raízes adventícias depende diretamente da ação de hormônios vegetais, destacando-se as auxinas, citocininas e giberelinas. O enraizamento adventício também pode ser potencializado pela aplicação de auxinas sintéticas, como o ácido indol-3-butírico (IBA) em diferentes concentrações (Hartmann et al., 2002; Andrejow, 2006; Antonelli, 2013; Miranda, 2015). O IBA apresenta-se como a auxina exógena mais indicada ao uso em práticas de propagação vegetativa principalmente devido à ausência de toxicidade em uma larga escala de concentrações. Além disso, internamente às plantas, podem ser encontradas substâncias ditas como cofatores de enraizamento e substâncias inibidoras de enraizamento (Hartmann et al., 2002). Os cofatores de enraizamento são substâncias endógenas, como compostos fenólicos e outros, que atuam de modo sinérgico com as auxinas no enraizamento de propágulos vegetativos (Hartmann et al., 2002).

As plantas podem ser classificadas em três grupos distintos, variando conforme o seu potencial rizogênico. O primeiro grupo é constituído por plantas de fácil enraizamento, as quais possuem em seus tecidos as substâncias endógenas necessárias à iniciação e desenvolvimento radicial, sendo desnecessária a aplicação de quaisquer substâncias exógenas que estimulem a formação de raízes nos propágulos vegetais. O segundo grupo é composto por plantas relativamente fáceis de enraizar, uma vez que apresentam em seus tecidos os cofatores necessários, mas não apresentam as concentrações satisfatórias de auxinas. Assim, a aplicação de auxinas exógenas favorece o enraizamento das estacas. Já o terceiro grupo caracteriza-se por plantas de difícil enraizamento, as quais não apresentam um ou mais cofatores, independentemente da concentração de auxina endógena existente. Neste caso, a aplicação de auxinas sintéticas não é suficiente para estimular a rizogênese nos propágulos vegetativos (Hartmann et al., 2002).

Nesse mesmo contexto, a permanência das folhas nos propágulos aparece como um ponto a ser entendido, uma vez que esse órgão atua como uma região fotossintetizante, de reserva energética, e fornecedor de hormônios vegetais. Quanto ao tipo das estacas, estas podem ser herbáceas, lenhosas ou semilenhosas, variando em função do local de coleta e do tipo de planta. As estacas herbáceas apresentam, via de regra, maior competência ao enraizamento quando comparadas com as lenhosas, pois apresentam maior sensibilidade do tecido vegetal à ação dos reguladores vegetais e menor teor de lignina em seus tecidos (Andrejow, 2006; Antonelli, 2013).

A idade ontogenética, a qual se refere à passagem das plantas pelas sucessivas fases do seu desenvolvimento, desde a embriogênese até a senescência, tem relação direta com o potencial rizogênico dos propágulos vegetativos retirados das plantas matrizes. Conforme o aumento da idade ontogenética, ocorre um acúmulo de substâncias inibidoras de enraizamento nos tecidos vegetais e concomitante redução dos níveis de polifenóis endógenos, responsáveis pela prevenção da degradação de IAA (Pimenta et al., 2005; Prado, 2014). Com isso, ocorre um acúmulo de monofenóis nos tecidos vegetais, os quais ativam a síntese da enzima IAA oxidase/peroxidase e ocasiona a oxidação do IAA endógeno, ocasionando, conseqüentemente, o decaimento da capacidade de enraizamento adventício dos propágulos vegetais (Pimenta et al., 2005; Dias et al., 2012; Prado, 2014)

As mudanças nas características das plantas devido à maturação dos tecidos vegetais não param apenas na redução da capacidade de enraizamento, mas também na qualidade do sistema radicial formado, na velocidade em que o material vegetal forma os primórdios radiciais e na sobrevivência e vigor das mudas no campo. Nessa circunstância, o rejuvenescimento de células e tecidos apresenta-se como um dos aspectos mais importantes para obter sucesso na clonagem de material obtido a partir de matrizes maduras, pois restaura a competência ao enraizamento (Dias et al., 2012; Miranda, 2015).

### **2.5.2 Fatores externos**

Ao se tratar dos fatores exógenos ao sucesso da rizogênese, o tratamento com reguladores vegetais aparece como um método bastante eficiente para indução da rizogênese. A aplicação destes compostos químicos sintéticos contribui com o aumento do índice de enraizamento, velocidade de enraizamento, número e comprimento de raízes, qualidade do sistema radicial formado, assim como na uniformidade da indução radicial. A formação de raízes adventícias é influenciada por todas as classes de reguladores de crescimento, bem como por compostos inibidores ou retardadores e cofatores de enraizamento, poliaminas e compostos fenólicos (Hartmann et al., 2002; Alcantara et al., 2008; Dias et al., 2012)

Dentre os reguladores vegetais, é sabido que as auxinas são fundamentais para o processo de iniciação radicial. Este processo é dependente tanto da aplicação exógena como da quantidade endógena sintetizada pela própria planta. A auxina mais amplamente utilizada para aumentar o potencial de rizogênese é o ácido indol-3-butírico (IBA), por apresentar menor toxicidade e maior amplitude de concentrações quando comparada com outras auxinas (Wendling et al., 2006; Alcantara et al., 2008; Dias et al., 2012).

Fatores externos como temperatura e umidade também são aspectos fundamentais para alcançar boas taxas de enraizamento, pois participam de reações regulatórias do metabolismo vegetal e influenciam diretamente no potencial rizogênico. A luminosidade, por sua vez, deve ser mantida em um nível adequado para a manutenção de uma taxa fotossintética que supra a demanda de carboidratos necessários para a sobrevivência dos propágulos vegetativos e garantam a iniciação radicial, sem comprometer seu vigor vegetativo (Antonelli, 2013).

As alterações fisiológicas que acontecem nas plantas matrizes durante as estações do ano exercem grande influência no enraizamento adventício. Essas alterações são determinadas pelas condições climáticas de cada estação e resumem-se em um desequilíbrio hormonal, variação na síntese de fotoassimilados e lignificação dos tecidos vegetais. Desse modo, faz-se necessário, para cada espécie, determinar a época ideal para coleta do material vegetal, sendo repouso ou crescimento vegetativo. Estações do ano com temperaturas mais elevadas coincidem, geralmente, com o aumento da atividade celular das brotações, maiores taxas de crescimento das plantas e maiores índices de enraizamento, uma vez que as células vegetais apresentam maior atividade metabólica (Alcantara et al., 2008; Antonelli, 2013; Miranda, 2015).

Por fim, outros fatores, como a composição química e física dos substratos utilizados para o enraizamento e algumas situações de estresses abióticos podem também atuar de modo direto na determinação do potencial rizogênico das brotações vegetais (Andrejow et al., 2008).

### **2.5.3 Reguladores vegetais**

Os hormônios vegetais, também conhecidos como fitohormônios, são compostos orgânicos endógenos, sintetizados em pequenas concentrações pelas plantas e que proporcionam a iniciação de um conjunto de processos metabólicos, morfológicos e fisiológicos, geralmente relacionados ao crescimento e desenvolvimento do vegetal (Dario et al., 2005; Guerreiro, 2008; Miranda, 2015; Taiz et al., 2017). As modificações morfológicas e fisiológicas ocasionadas pelos hormônios vegetais dependem da associação de três fatores: concentração no seu sítio de atuação; sensibilidade das células ou dos tecidos; e presença de outros hormônios vegetais, que podem atuar de modo conjunto e influenciar nos efeitos um do outro (Guerreiro, 2008).

Tais compostos podem apresentar ação local, no próprio sítio onde são sintetizados, ou podem ser transportados para outros sítios da planta, via xilema ou floema, atuando sobre aspectos locais de crescimento e desenvolvimento (Guerreiro, 2008; Moterle et al., 2011). Além disso, podem atuar em diferentes fases do desenvolvimento vegetal, tanto em plantas juvenis quanto em plantas com maior idade

ontogenética, desencadeando uma série de eventos metabólicos que repercutem em mudanças morfológicas e fisiológicas (Dario et al., 2005; Moterle et al., 2011).

Em relação aos reguladores vegetais, estes são substâncias sintéticas que, ao serem aplicadas exogenamente às plantas, provocam a promoção, inibição ou modificação de uma série de efeitos fisiológicos semelhantes aos gerados pelos fitohormônios, como germinação, emergência e desenvolvimento inicial das plantas, alongamento do caule, divisão e alongamento celular, crescimento de frutos, abscisão foliar, florescimento, enraizamento, entre outros (Neto et al., 2004; Abrantes et al., 2011; Botin e Carvalho, 2015; Taiz et al., 2017).

Tanto os fitohormônios quanto os reguladores vegetais são agrupados em cinco classes principais: auxinas (ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico e ácido naftaleno acético), citocininas (zeatina e cinetina), giberelinas (em diversas formas), etileno e ácido abscísico (Miranda, 2015; Taiz et al., 2017), além dos brassinoesteróides, jasmonatos e salicilatos. Dentre estes, as auxinas representam uma das classes mais estudadas pois, além de serem o grupo hormonal sintetizado em maior quantidade pelas plantas, é também o principal promotor do crescimento sintetizado por bactérias associativas, as quais podem atuar diretamente nos mecanismos de expansão e diferenciação celular, resultando em um maior e mais significativo crescimento e desenvolvimento vegetal (Moterle et al., 2011; Vaz, 2014; Caixeta, 2015).

## 2.6 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Os estudos das interações entre plantas e microrganismos sofreu um aumento significativo nas últimas décadas, uma vez que a compreensão dos fatores envolvidos no crescimento vegetal, a partir do uso de determinadas bactérias, apresenta relevância significativa para diversas atividades comerciais e econômicas (Silveira, 2008; Ferreira et al., 2014). A utilização de microrganismos como inoculantes biológicos e/ou biofertilizantes aparece, no cenário agrícola atual, como uma alternativa sustentável e promissora para a redução ou até mesmo substituição do uso de produtos químicos sintéticos, visando maiores ganhos em produtividade, menor poluição do meio ambiente e menor custo para o produtor (Melo et al., 2012; Boracin et al., 2016; Barbosa et al., 2017).

A essas bactérias responsáveis por estimular e beneficiar o crescimento de diversas espécies vegetais foi atribuído o nome de “Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas” (BPCP). Estas são capazes de se associar às plantas e se desenvolver no interior da planta hospedeira, sendo chamadas de endofíticas, ou na superfície externa, denominadas epifíticas (Silveira, 2008; Lira-Cadete et al., 2012). As bactérias epifíticas ou exobactérias são microrganismos que vivem em associação, principalmente, com raízes e estão abundantemente presentes na região da rizosfera, a qual é rica em exsudatos fotossintéticos e nutrientes. Esses microrganismos atuam de modo simbiótico e produzem efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento vegetal (Silveira, 2008; Brunetta et al., 2010; Miranda, 2015).

Já as bactérias endofíticas ou endobactérias são aquelas que colonizam os tecidos internos das plantas e estão associadas a elas com atuação benéfica. A vantagem ecológica dessas bactérias é a capacidade de crescimento e colonização da região do rizoplane, além de se desenvolverem no interior dos tecidos vegetais, não havendo competitividade com outros microrganismos. Além disso, o ambiente interno favorece a sobrevivência desses microrganismos por não apresentar influência de temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta. Podem colonizar órgãos vegetais como sementes, raízes e tubérculos, assim como localidades específicas dentro dos tecidos das raízes, algumas células da epiderme, endoderme e tecidos vasculares. Uma vez que a colonização por essas bactérias endofíticas ocorre de forma sistêmica, as condições fisiológicas e morfológicas das plantas hospedeiras podem sofrer alterações (Sakiyama, 2001; Brunetta, 2006; Da Costa, 2014; Vaz, 2014; Panigrahi et al., 2019; Hernández-Soberano et al., 2020).

A colonização interna dos tecidos vegetais por esses microrganismos pode ocorrer de diversas maneiras, via estômatos, lenticelas, hidatódios, ferimentos causados por danos mecânicos ou fungos patológicos, áreas de emergência de raízes laterais e radículas em desenvolvimento em sementes germinadas. Dentre esses, os ferimentos e as raízes em crescimento são as principais portas de entrada. Além disso, muitas bactérias endofíticas possuem a capacidade de degradar paredes celulares através da síntese de enzimas hidrolíticas, como celulases e pectinases (Sakiyama, 2001; Santos e Varavallo, 2011; Vieira, 2012; Santoyo et al., 2016)

Esses microrganismos, encontrados tanto na rizosfera quanto no interior dos tecidos vegetais, contribuem direta ou indiretamente para a promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal. Os mecanismos diretos envolvem a fixação biológica de

nitrogênio, solubilização de fosfato, quelação de ferro e síntese de fitohormônios, enquanto os indiretos ocorrem por meio da indução de resistência sistêmica, atuando como agentes de controle biológico pela supressão de patógenos, e produção de sideróforos (Dobbelaere et al., 2003; Gamalero e Glick, 2015; Santoyo et al., 2016; Panigrahi et al., 2019).

A associação entre microrganismos e planta hospedeira é simbiótica, isto é, enquanto as bactérias recebem nutrientes e colonizam órgãos vegetais, a planta é beneficiada com o aumento do seu crescimento e desenvolvimento. Através desse mutualismo, os principais efeitos analisados na promoção do crescimento são: aumentos da taxa de germinação de sementes, alongamento das raízes e maior desenvolvimento do sistema radicial, maior crescimento em diâmetro e altura de caules, aumento do número de folhas e área foliar, maior sobrevivência de mudas, obtenção de resistência a patógenos e estresses abióticos (Vaz, 2014; Santos e Varavallo, 2011; Boracin et al., 2016; Barbosa et al., 2017).

### **2.6.1 Síntese de auxinas por bactérias promotoras de crescimento em plantas**

Dentre os mecanismos de beneficiamento vegetal anteriormente citados, a síntese de reguladores vegetais por bactérias apresenta-se como uma grande aliada no aumento das taxas de crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo a modulação das auxinas e sua relação com o etileno um fator determinante. Esses reguladores beneficiam o aumento da área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas e, principalmente, maior desenvolvimento do sistema radicial (Riov e Yang, 1989; Boracin et al, 2016).

As auxinas representam a classe de hormônios vegetais mais estudada e é sabido que a capacidade de síntese desse fitohormônio não é observada somente em plantas, mas também por microrganismos associativos encontrados em diversas espécies vegetais. A maioria das bactérias presentes no solo é capaz de sintetizar auxinas, podendo ser uma estratégia para detoxificação do excesso de triptofano liberado pelas raízes na região da rizosfera, um aminoácido deletério para as células bacterianas (Dobbelaere et al., 2003; Brunetta, 2006; Panigrahi et al., 2019). As alterações morfológicas decorrentes da síntese de auxinas, como aumento do comprimento de raízes adventícias e secundárias, são devidas às principais respostas fisiológicas geradas por elas: alongação celular e estímulo da divisão e diferenciação

celular. Vale ressaltar que altas concentrações de auxinas nos tecidos das plantas podem gerar prejuízos ao crescimento vegetal (Dobbelaere et al., 2003; Raven et al., 2007; Vega-Celedón et al., 2016; Panigrahi et al., 2019).

Dentre as auxinas, o ácido indol-3-acético (IAA) é o principal regulador envolvido na associação entre plantas e microrganismos. Este controla uma grande variedade de processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal e desempenha um papel imprescindível na formação e arquitetura do sistema radicular das plantas. O ácido indol-3-acético bacteriano, associado com o IAA endógeno sintetizado pela própria planta, regula diversos acontecimentos importantes no ciclo de vida desta, como a germinação de sementes, formação do xilema, proliferação e alongação de células vegetais, emergência de raízes laterais e adventícias, movimentos de tropismos, florescimento e frutificação (Aloni et al., 2006; Tsavkelova et al., 2006).

O etileno, em associação com as auxinas, está envolvido na formação de primórdios de raízes e parte aérea, ramificação e alongamento da raiz, desenvolvimento de brotos laterais e floração. Além disso, está envolvido em processos como senescência de flores, amadurecimento de frutos e abscisão, produção de antocianina, síntese de substâncias voláteis e compostos orgânicos que garantem o aroma em frutas, abscisão e senescência de folhas. No entanto, quando encontrado em concentrações elevadas, paralisa o crescimento vegetal (Abeles et al., 1992; Brunetta, 2006; Glick, 2014).

A relação auxina/etileno é decorrente da ação da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintase, responsável pela síntese de etileno a partir de S-adenosil metionina, durante o desenvolvimento normal da planta e quando a mesma é exposta a algum estresse. O ácido indol-3-acético (IAA), a auxina mais comumente sintetizada, ativa a transcrição da ACC sintase, aumentando os níveis de etileno e inibindo o crescimento vegetal. Assim, bactérias que produzem altas quantidades de IAA frequentemente inibem o crescimento vegetal, não necessariamente devido ao aumento do nível de etileno nos tecidos vegetais, mas porque o etileno produzido inibe a transcrição de fatores de resposta à auxina. Contudo, os efeitos do balanço entre esses dois fitohormônios deve ser avaliado sobre o enraizamento e promoção do crescimento vegetal (Abeles et al., 1992; Spaepen et al., 2007; Glick, 2014).



### 3 CAPÍTULO I: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A PARTIR DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*.

#### RESUMO

A aplicabilidade dos microrganismos endofíticos na agricultura é um processo sustentável que se mostra promissor e visa a otimização de aspectos morfológicos e fisiológicos das plantas. A capacidade de síntese de hormônios vegetais por esses microrganismos gera plantas mais desenvolvidas e um cultivo agrícola mais rentável. A auxina ácido indol-3-acético (IAA) estimula respostas rápidas de alongamento, divisão e diferenciação celular, o que contribui positivamente para o crescimento vegetal. À vista disso, este estudo objetivou isolar, caracterizar e identificar isolados bacterianos de *Pinus* e quantificar a sua síntese de IAA. O isolamento foi realizado a partir da trituração de acículas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* e incubação em meio de cultivo DYG's sólido para crescimento bacteriano. A caracterização fenotípica das colônias bacterianas foi realizada observando características como formato, bordas, elevação, superfície, produção de muco, transparência e coloração das colônias. Para a identificação molecular, onze isolados bacterianos foram selecionados para extração do DNA e análise do gene 16S rRNA, utilizado para análises filogenéticas devido às baixas taxas de mutação e evolução desta região gênica. Árvores filogenéticas foram construídas para verificar a similaridade com sequências 16S rRNA encontradas e comparadas no GenBank (National Center for Biotechnology Information). Os mesmos onze isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade de síntese de IAA pelo método de Salkowski. Foram obtidos 39 isolados bacterianos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Os onze isolados selecionados apresentaram similaridade superior a 80% aos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. Os isolados CNPF 307 ( $1055,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CNPF 317 ( $581,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram os maiores valores para biossíntese de IAA em meios de crescimento sem a suplementação de L-triptofano. Na presença do aminoácido L-triptofano, o isolado CNPF 317 atingiu  $425,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IAA sintetizado.

Palavras-chave: microrganismos endofíticos, gene 16S, auxinas.

## ABSTRACT

The applicability of endophytic microorganisms in agriculture is a sustainable process that seems to be promising and to optimize plants morphological and physiological aspects. The ability to synthesize plant hormones by these microorganisms provides more developed plants and greater profitable cultivation. The auxin indole-3-acetic acid (IAA) stimulates faster responses of cell elongation, division and differentiation, what contributes positively to plant growth. In that way, this study aimed to isolate, characterize and identify bacterial isolates from *Pinus* and quantify IAA synthesis. The bacterial isolation was conducted by crushing acicles of *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* and incubation in solid DYG's culture medium for bacterial growth. The morphological characterization of bacterial colonies was performed by observing characteristics such as shape, edges, elevation, surface, production of mucus, transparency and color. For molecular identification, eleven bacterial isolates were selected for DNA extraction and analysis of the 16S rRNA gene, used for phylogenetic analysis due to the low mutation and evolution rates of this gene. Phylogenetic trees were built to verify the similarity with 16S rRNA gene sequences, which were compared to sequences found on GenBank (National Center for Biotechnology Information). The same eleven isolates were evaluated about IAA synthesis by Salkowski method. 39 bacterial isolates were obtained from *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. The eleven selected isolates showed similarity higher than 80% to *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Staphylococcus* genus. The isolates CNPF 307 ( $1055,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and CNPF 317 ( $581,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) reached the highest values for IAA biosynthesis in growth medium without L-tryptophan supplementation. With the addition of L-tryptophan, the isolate CNPF 317 reached  $425,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  of IAA synthesized.

Keywords: endophytic microorganisms, 16S gene, auxins.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O emprego de microrganismos em práticas agrícolas, visando aumentar a produtividade e a sustentabilidade das plantações, vem apresentando um constante crescimento nos últimos anos devido aos inúmeros benefícios que estes fornecem às plantas (Mariano et al., 2004; Orlikowska et al., 2017). O estudo das interações entre plantas e microrganismos busca entender os diversos fatores envolvidos, principalmente, na promoção de crescimento e no controle de pragas em grandes culturas vegetais. A utilização de bactérias na formulação de biofertilizantes e/ou bioinoculantes vem sendo amplamente estudada por vários órgãos internacionais, em diversas partes do mundo, uma vez que podem reduzir os custos de produção dos plantios, aumentar a produtividade das culturas, substituir produtos químicos, contribuir para a preservação do meio ambiente e diminuir de modo significativo o impacto ambiental gerado pela agricultura mundial (Mariano et al., 2004; Santos e Varavallo, 2011; Ferreira et al., 2014; Orlikowska et al., 2017).

O ambiente em que a planta cresce e se desenvolve é constituído por uma extensa rede microbiota, podendo esta ser deletéria, neutra ou benéfica ao ciclo de vida das plantas, colonizando o interior ou exterior dos tecidos vegetais. Os microrganismos que exercem efeitos benéficos ao estimularem o crescimento e desenvolvimento vegetal são denominados como “promotores de crescimento vegetal” e atuam sobre o ciclo da planta de modo direto, através do aumento na disponibilidade de nutrientes minerais e produção de fitohormônios, e de modo indireto pela supressão de microrganismos fitopatogênicos que habitam o filoplano ou rizosfera das plantas. Aos microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais é dado o nome de endofíticos (Vieira, 2012; Spassin, 2014; Ribeiro e Pamphile, 2017).

Na prática, o caráter endofítico é atribuído às bactérias isoladas através de tecidos vegetais superficialmente estéreis, delimitando o habitat endofítico. Ou seja, todo o contaminante da superfície do material vegetal utilizado para o isolamento deve ser eliminado em um processo de esterilização superficial sem que haja danos à microbiota endofítica. O método de isolamento de bactérias endofíticas mais comumente empregado é a trituração, no qual o material vegetal é triturado, em condições assépticas e, posteriormente diluído e inoculado em meios de cultura seletivos (Sakiyama, 2001).

As bactérias têm recebido destaque dentre os microrganismos endofíticos, pois possuem a capacidade de penetrar nos tecidos das plantas hospedeiras e colonizá-los de forma sistêmica, podendo alterar condições fisiológicas e morfológicas dos hospedeiros (Santos e Varavallo, 2011; Vaz, 2014). A associação bactéria endofítica e planta hospedeira ocorre, na maioria das vezes, como simbiótica ou mutualística. Isto é, os endofíticos recebem nutrientes e proteção da planta e, em contrapartida, esta é beneficiada com o aumento do seu crescimento e desenvolvimento, principalmente através da síntese de auxinas e supressão de microrganismos deletérios (Vaz, 2014; Orlikowska et al., 2017). A biossíntese de fitohormônios como as auxinas, giberelinas e citocininas é importante em processos de promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas. As auxinas são os principais hormônios sintetizados tanto pelas plantas quanto por microrganismos promotores de crescimento. Estas são percebidas pelas plantas e convertidas em sinais bioquímicos, para então desencadear respostas fisiológicas específicas, a partir das quais ocorre a formação de raízes laterais e pelos radiculares, maior desenvolvimento de órgãos vegetais e aumento do crescimento vegetal como um todo (Hardoim et al., 2015; Ishizawa, 2017; Orlikowska et al., 2017).

Ademais, aos endofíticos também tem sido atribuída a capacidade de solubilização do fósforo presente nos solos através da produção de ácidos orgânicos ou enzimas fosfatases, as quais o liberam no formato de fosfato inorgânico dissolvido, e fixação biológica de nitrogênio (FBN), no qual o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) é fixado e transformado em amônia ( $NH_4^+$ ) e/ou nitrato ( $NO_3^-$ ), compostos que estão relacionados com o crescimento vegetal (Barbosa, 2005; Hardoim et al., 2015; Ishizawa, 2017; Miguel et al., 2021). Alguns endofíticos são capazes de ativar a transcrição de genes de resistência das plantas e, conseqüentemente, desencadear a Resistência Sistêmica Induzida (ISR), através da qual ocorre a biossíntese de compostos que atuam sobre o patógeno ou anatomia das plantas, como no caso da quitosana, que incita o acúmulo de calose no interior das células vegetais da epiderme e do córtex exterior. Outros compostos como sideróforos, antibióticos, compostos voláteis, antivirais e inseticidas também são sintetizados por muitos endofíticos e apresentam grande potencial biotecnológico (Barbosa, 2005; Ishizawa, 2017; Miguel et al., 2021).

Os objetivos deste estudo foram o isolamento da comunidade bacteriana endofítica de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, caracterização e identificação

molecular dos microrganismos endofíticos e detecção da síntese de auxina ácido indol-3-acético pelos isolados bacterianos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolamento, purificação e caracterização fenotípica

O presente estudo foi realizado no início no mês de maio de 2019 no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e no Laboratório de Microbiologia do Solo, pertencentes à Embrapa Florestas, Colombo (PR). O material vegetal foi coletado de brotações em fase de multiplicação *in vitro* de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de  $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ . O material vegetal estabelecido *in vitro* apresenta origem seminal e encontra-se em fase de multiplicação por pelo menos três anos.

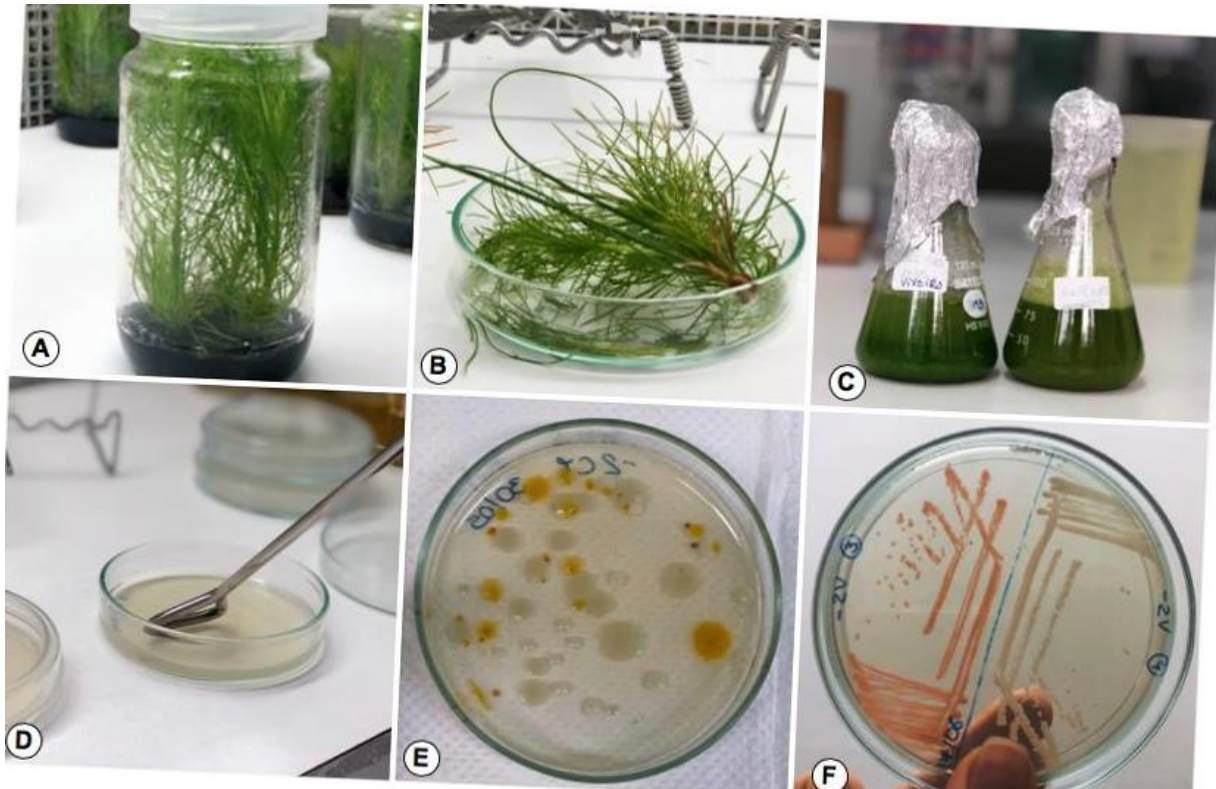
De acordo com metodologia proposta por Döbereiner et al. (1995), foram pesados 10 gramas de acículas e realizou-se a desinfestação do material vegetal: 30 segundos de imersão em álcool 70°, 2 minutos e 30 segundos em solução a 6% de hipoclorito de sódio e seis lavagens água destilada autoclavada. Já desinfestado, o material vegetal foi processado com 90 mL de solução salina de cloreto de sódio a 0,85% (Figura 1).

Foi realizada uma diluição seriada de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$  e, para cada concentração, foram inoculadas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  nos meios de cultivo DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) ( $2\ \text{g L}^{-1}$  glicose;  $2\ \text{g L}^{-1}$  ácido málico;  $1,5\ \text{g L}^{-1}$  peptona bacteriológica;  $2\ \text{g L}^{-1}$  extrato de levedura;  $0,5\ \text{g L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,5\ \text{g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,5\ \text{g L}^{-1}$  ácido glutâmico;  $15\ \text{g L}^{-1}$  Ágar) e LGI-P ( $5\ \text{g L}^{-1}$  sacarose;  $0,2\ \text{g L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,6\ \text{g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,2\ \text{g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,02\ \text{g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,002\ \text{g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,015\ \text{g L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mL/L Azul de Bromotimol), permanecendo em estufa de crescimento a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 10 dias.

Após o período de incubação, colônias bacterianas fenotipicamente distintas foram selecionadas e subcultivadas em meio DYG's para a obtenção de isolados bacterianos (Figura 1). Esses isolados foram observados em lupa estereoscópica sob luz refletida com aumento de 20x e caracterizados quanto a forma da colônia (puntiforme, circular, irregular ou filamentosa), elevação da colônia (plana, convexa, pulvinada, côncava/umbilicada, elevada/lenticulada, protuberante/umbonada), borda da colônia (lisa/inteira, ondulada, lobada, dentada ou filamentosa), superfície da colônia (lisa, rugosa ou papilada), produção de muco (escassa, pouca, moderada ou

muita), transparência da colônia (opaca ou translúcida) e coloração da colônia. Posteriormente à caracterização, os isolados bacterianos foram armazenados em óleo mineral e glicerol para análises futuras, sendo mantidos em temperatura ambiente e freezer, respectivamente.

**FIGURA 1** – PROCESSO DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021). Legenda: A – Brotações estabelecidas *in vitro* de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*; B – Corte de acículas de brotações para trituração; C – Solução com NaCl a 0,85% resultante após trituração de acículas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*; D – Plaqueamento das soluções em meio DYG's sólido; E – Crescimento de colônias bacterianas diversas provenientes de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*; F – Colônias bacterianas purificadas.

### 3.2.2 Análises moleculares e filogenéticas

Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas, Colombo (PR), e foram utilizadas onze bactérias endofíticas selecionadas em avaliações previamente realizadas de germinação (Capítulo II) e miniestaquia (Capítulo III).

As bactérias isoladas foram cultivadas em meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido

glutâmico; 15 g L<sup>-1</sup> Ágar) por 48 horas e o DNA bacteriano de colônias isoladas foi extraído através dos diversos processos mecânicos e químicos estabelecidos pelo protocolo do kit comercial “PureLink Genomic DNA Extraction Mini Kit” (cat. K182001, Invitrogen® – Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Para confirmação da extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio.

Posteriormente, foi realizada a reação de PCR em um aparelho de termociclagem convencional (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems®). Para a reação de PCR, seguiu-se a mistura de 2 µL do DNA extraído; 5 µL Reaction Buffer; 1 µL de Forward Primer; 1 µL de Reverse Primer; 0,4 µL de Taq Polymerase; 5 µL de dNTP's; 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> e 331 µL de água destilada ultrapura. As condições de amplificação do DNA extraído das bactérias na técnica de PCR de acordo com as características dos primers utilizados seguiram as seguintes etapas:

1° estágio: desnaturação a 94°C por 2 minutos;

2° estágio: anelamento dos primers a 55°C por 40 segundos;

3° estágio: extensão a 72°C por 7 minutos. Essa sequência de eventos é repetida por 30 ciclos, a fim de gerar inúmeras cópias da sequência de DNA.

Para a amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os primers forward 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado usando o iniciador 27F e em um sequenciador de DNA 3730xl (Applied Biosystems®, Foster, City, CA, EUA), pela empresa Macrogen, na Coreia do Sul. O gene 16S rRNA é amplamente utilizado em análises gênicas e taxonômicas devido à sua elevada taxa de conservação entre organismos procariontes.

As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Para cada gene foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos. As sequências de DNA do gene 16S rRNA foram alinhadas usando o ClustalW (Thompson et al., 1994). Análises filogenéticas e evolutivas moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis – Version 10.1.8) (Kumar et al., 2018). As árvores filogenéticas foram construídas a partir do método “neighbour-joining” e o modelo de 2 parâmetros de Kimura (Kimura, 1980), realizando mil repetições.



### 3.2.3 Síntese de ácido indol-3-acético por bactérias endofíticas

As análises descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, Laboratório de Microbiologia do Solo e Laboratório de Biologia Molecular, pertencentes à Embrapa Florestas, Colombo (PR).

Para a quantificação de IAA, as bactérias foram cultivadas em tubos de ensaios com meio DYG's líquido (Rodrigues Neto et al., 1986) (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico) por 24 horas em shaker a 28±2°C e agitação constante de 150 rotações por minuto (rpm).

Após o crescimento, ajustou-se a densidade óptica dos isolados bacterianos para 0,6-0,8 a 630 nanômetros (nm) em espectrofotômetro. Alíquotas de 500 µL dos inóculos bacterianos foram transferidos para 6 mL de meio DYG's líquido suplementados com o aminoácido L-triptofano (100 mg L<sup>-1</sup>) e sem a adição de L-triptofano. A incubação ocorreu no escuro, em shaker com temperatura constante a 28±2°C e 150 rpm, por 48 horas.

Passado o período de incubação foi realizada a centrifugação das amostras por cinco minutos a 10.000 rpm em centrífuga (Centrifuge 5424 R, Eppendorf®). Para quantificação dos compostos indólicos sintetizados, foram retirados 2 mL do sobrenadante e adicionados 2 mL do reagente de Salkowski. As amostras ficaram incubadas no escuro em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos para o desenvolvimento de coloração rosada, que é indicativo da produção de IAA. A intensidade da coloração foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm.

A intensidade da coloração e quantificação da síntese de IAA foi estimada a partir da construção de uma curva padrão com as leituras de absorvância de soluções de IAA comercial (Sigma-Aldrich®) em concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, que resultou na equação  $y = 0,0003x + 0,0029$  ( $R^2 = 0,9500$ ), com o potencial de produção de IAA sendo expresso em µg de IAA por mL.

O experimento contou com dois controles positivos para a síntese de IAA, constituídos por inóculos bacterianos de *Azospirillum brasilense* estirpe 2083 e *Azospirillum brasilense* estirpe 2084. O controle negativo foi realizado com meio DYG's líquido sem a inoculação de bactérias.

Foi aplicado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 39 tratamentos e 3 repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental

constituída por um tubo de ensaio com meio DYG's Líquido. Foram realizadas 234 análises de IAA, sendo 117 na presença de L-triptofano e 117 na ausência de L-triptofano. As variáveis foram analisadas seguindo a análise de variância pelo teste de Bartlett e as médias dos resultados obtidos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Isolamento, purificação e caracterização fenotípica

A partir da trituração de brotações de *P. caribaea* var. *hondurensis* foram obtidos 39 isolados de bactérias endofíticas descritas na Tabela 1. Em estudo conduzido por Assumpção (2008), o método de isolamento por trituração proporcionou um maior número de colônias bacterianas e um maior número de gêneros em relação ao método de separação por cotilédones de soja. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2001), que detectaram maior número de isolados endofíticos com maceração do que com fragmentação das folhas de porta-enxertos de citrus. Contrariamente, Ishizawa (2017) obteve menor número de isolados bacterianos pela trituração em relação à fragmentação de folhas de melancia (*Citullus lanatus* (Thunb.) Mastum. & Nakai). De modo geral, é possível inferir que o método de isolamento por trituração ou maceração do material vegetal é mais empregado em estudos relacionados a obtenção de microrganismos endofíticos, sendo estes, bactérias, fungos ou leveduras. Este método possibilita uma expressão mais acentuada do microbioma endofítico em relação ao método de fragmentação, uma vez que os tecidos internos apresentam maior exposição (Barbosa, 2005; Ishizawa, 2017).

As variações quanto à morfologia das colônias encontram-se demonstradas na Tabela 1, onde a maioria das colônias apresentaram formato circular (74,36%), enquanto 17,95% apresentaram forma irregular e 7,69% puntiforme. Para a característica elevação das colônias, 35,9% apresentaram elevação convexa, 25,64% lenticular, 23,08% umbilicada, 12,82% plana e 2,56% protuberante. Quanto à borda das colônias, 41,03% tem bordas lisas, 41,03% onduladas e 17,94% lobada. A superfície das colônias isoladas foi majoritariamente lisa (66,67%) e a produção de muco foi, em sua maioria, moderada e escassa (35,9% e 33,33%, nesta ordem). As colônias apresentam-se opacas e translúcidas em 64,10% e 35,9% dos isolados, respectivamente. Em relação a coloração, as cores prevalentes foram amarela (48,72%) e bege (38,46%), sendo também observadas colônias rosas e brancas em menores frequências.

**TABELA 1 –** CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.

<b>Isolados</b>	<b>FC</b>	<b>EC</b>	<b>BC</b>	<b>SC</b>	<b>PM</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>
<b>CNPF 293</b>	Circular	Convexa	Lisa	Rugosa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 294</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 295</b>	Puntiforme	Convexa	Ondulada	Lisa	Escassa	Translúcida	Amarela
<b>CNPF 296</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa	Escassa	Translúcida	Amarela
<b>CNPF 297</b>	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Moderada	Opaca	Bege
<b>CNPF 298</b>	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Escassa	Translúcida	Bege
<b>CNPF 299</b>	Circular	Protuberante	Ondulada	Lisa	Pouca	Translúcida	Bege
<b>CNPF 300</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Moderada	Opaca	Branca
<b>CNPF 301</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Papilada	Pouca	Translúcida	Amarela
<b>CNPF 302</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Papilada	Moderada	Opaca	Amarela
<b>CNPF 303</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Rugosa	Pouca	Opaca	Amarela
<b>CNPF 304</b>	Circular	Lenticular	Lisa	Rugosa	Pouca	Opaca	Amarela
<b>CNPF 305</b>	Circular	Lenticular	Lisa	Lisa	Pouca	Opaca	Bege
<b>CNPF 306</b>	Puntiforme	Convexa	Lisa	Lisa	Moderada	Opaca	Rosa
<b>CNPF 307</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 308</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Pouca	Opaca	Bege
<b>CNPF 309</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Pouca	Opaca	Bege
<b>CNPF 310</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Papilada	Moderada	Opaca	Amarela
<b>CNPF 311</b>	Circular	Umbilicada	Ondulada	Lisa	Moderada	Translúcida	Amarela
<b>CNPF 312</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Rugosa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 313</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Rugosa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 314</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Moderada	Opaca	Rosa
<b>CNPF 315</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Papilada	Moderada	Opaca	Amarela
<b>CNPF 316</b>	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Moderada	Opaca	Rosa
<b>CNPF 317</b>	Circular	Lenticular	Lisa	Lisa	Escassa	Translúcida	Bege
<b>CNPF 318</b>	Circular	Lenticular	Lisa	Lisa	Escassa	Translúcida	Bege
<b>CNPF 319</b>	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 320</b>	Circular	Lenticular	Lisa	Rugosa	Escassa	Opaca	Amarela
<b>CNPF 321</b>	Irregular	Umbilicada	Lobada	Papilada	Pouca	Opaca	Amarela
<b>CNPF 322</b>	Irregular	Umbilicada	Ondulada	Papilada	Moderada	Opaca	Amarela
<b>CNPF 323</b>	Circular	Lenticular	Lobada	Rugosa	Moderada	Opaca	Bege
<b>CNPF 324</b>	Puntiforme	Plana	Lisa	Lisa	Escassa	Translúcida	Branca
<b>CNPF 325</b>	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Pouca	Translúcida	Bege
<b>CNPF 326</b>	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Translúcida	Bege
<b>CNPF 327</b>	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Pouca	Translúcida	Bege
<b>CNPF 328</b>	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Pouca	Translúcida	Bege
<b>CNPF 329</b>	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Translúcida	Bege
<b>CNPF 330</b>	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Opaca	Bege
<b>CNPF 331</b>	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Opaca	Amarela

Fonte: Baldin (2021). Tratamentos: FC (formato das colônias); EC (elevação da colônia); BC (borda da colônia); SC (superfície da colônia); PM (produção de muco da colônia); TC (transparência da colônia); CC (coloração da colônia).

A partir desta caracterização, é possível observar que os tecidos internos de *P. caribaea* var. *hondurensis* encontram-se habitados por inúmeras bactérias, as quais podem fornecer benefícios ao crescimento e desenvolvimento das plantas hospedeiras. Segundo Silva et al. (2012), as bactérias endofíticas encontram-se presentes, principalmente, na região da rizosfera e rizoplano, apresentando gradiente decrescente das raízes em direção às folhas. Tal fato pode ser atribuído às exigências nutricionais das plantas, que são maiores no início do desenvolvimento vegetal, período onde há formação das raízes. No decorrer do desenvolvimento vegetativo, as bactérias migram para locais com maior deslocamento de nutrientes, usados para o crescimento e metabolismo bacteriano, ou para tecidos preferenciais das plantas. Esses isolados foram devidamente identificados de acordo com numeração da Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas (CNPf) e armazenados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas, Colombo (PR).

### **3.3.2 Análises moleculares e filogenéticas**

Dentre os 39 isolados bacterianos obtidos foram selecionadas onze estirpes bacterianas específicas, conforme os resultados obtidos em estudos previamente realizados de germinação (Capítulo II) e miniestaquia (Capítulo III), os quais foram submetidos à extração de DNA, PCR, sequenciamento parcial e análises filogenéticas e moleculares.

A qualidade do DNA genômico extraído dos onze isolados bacterianos foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com adição de brometo de etídio. Foi utilizado o marcador 1KB Plus (Invitrogen®), como padrão de tamanho molecular, e azul de bromofenol. Os fragmentos extraídos para cada isolado obtiveram os seguintes tamanhos: CNPF 297 (1215 pb), CNPF 300 (1283 pb), CNPF 303 (1299 pb), CNPF 304 (1318 pb), CNPF 305 (1311 pb), CNPF 307 (1302 pb), CNPF 311 (1277 pb), CNPF 312 (1250 pb), CNPF 314 (961 pb), CNPF 317 (1254 pb) e CNPF 321 (1296 pb).

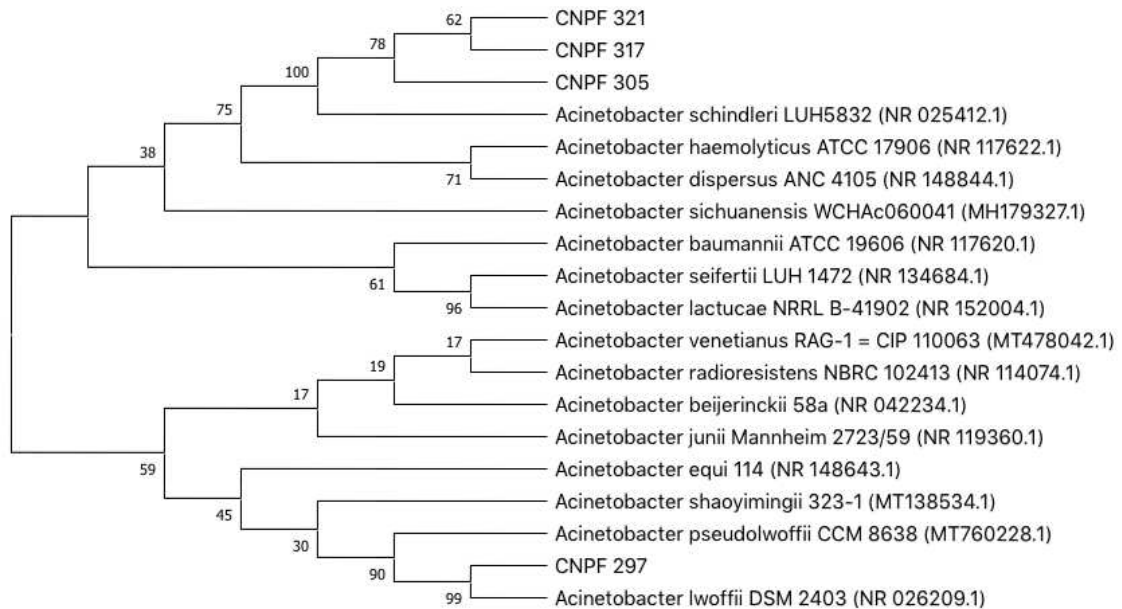
Devido a problemas na execução da metodologia de purificação do DNA ou do sequenciamento do gene 16S rRNA, não foram realizadas as análises moleculares e filogenéticas para o isolado CNPF 314.

As sequências do gene 16S rRNA foram submetidas a análises comparativas com as sequências depositadas no banco de dados genético do National Center for

Biotechnology Information (NCBI) pelo uso da ferramenta BLASTn. O gene 16S rRNA é rotineiramente utilizado para análises filogenéticas e taxonômicas, pois compreende uma região gênica altamente conservada e que, conseqüentemente, não sofreu grandes modificações na sequência de pares de bases conforme os processos evolutivos de seres procarióticos. Em um nível de bactérias, a análise deste gene fornece informações precisas em nível de espécies e estirpes (Johnson et al., 2019). Visto isso, foram obtidas sequências pertencentes aos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. As sequências obtidas apresentaram entre 80 e 100% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados. As análises pelo ClustalW (Thompson et al., 1994) e MEGAX (Kumar et al., 2018) permitiram um agrupamento mais congruente entre todos os gêneros. As árvores filogenéticas construídas agruparam todas as bandas de acordo com o filo e classes aos quais as bactérias pertencem, gerando unidades taxonômicas operacionais (OTUs).

Considerando a afiliação no nível de gênero, os isolados bacterianos CNPF 297, CNPF 305, CNPF 317 e CNPF 321 apresentaram elevada homologia com o gênero *Acinetobacter* (Figura 2). O fenograma apresentou em sua construção 19 OTUs agrupadas em diferentes clados, dentre os quais o isolado CNPF 297 assemelha-se com *Acinetobacter lwoffii* DSM 2403 a um nível de confiança de 99%, enquanto CNPF 305 assemelha-se a CNPF 317 e CNPF 321 a um nível de confiança de 78%. As bactérias CNPF 317 e CNPF 321 são homólogas em um clado único a 62%.

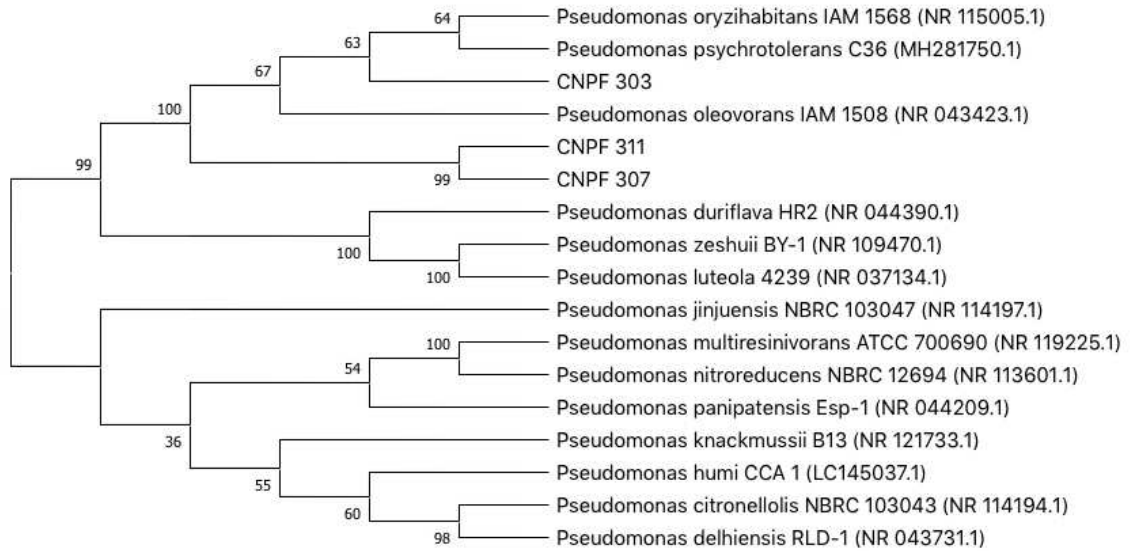
**FIGURA 2 –** ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Acinetobacter* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 297, CNPF 305, CNPF 317 E CNPF 321 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

No fenograma da Figura 3 é possível observar que os isolados CNPF 303, CNPF 307 e CNPF 311 são homólogos ao gênero *Pseudomonas*. A árvore filogenética apresentou 17 OTUs, sendo que CNPF 303 apresentou nível de confiança de 63% com *Pseudomonas oryzae* IAM 1568 e *Pseudomonas psychrotolerans* C36, enquanto CNPF 307 e CNPF 311 agruparam-se no mesmo clado com nível de confiança de 99%.

**FIGURA 3 –** ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Pseudomonas* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 303, CNPF 307 E CNPF 311 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.

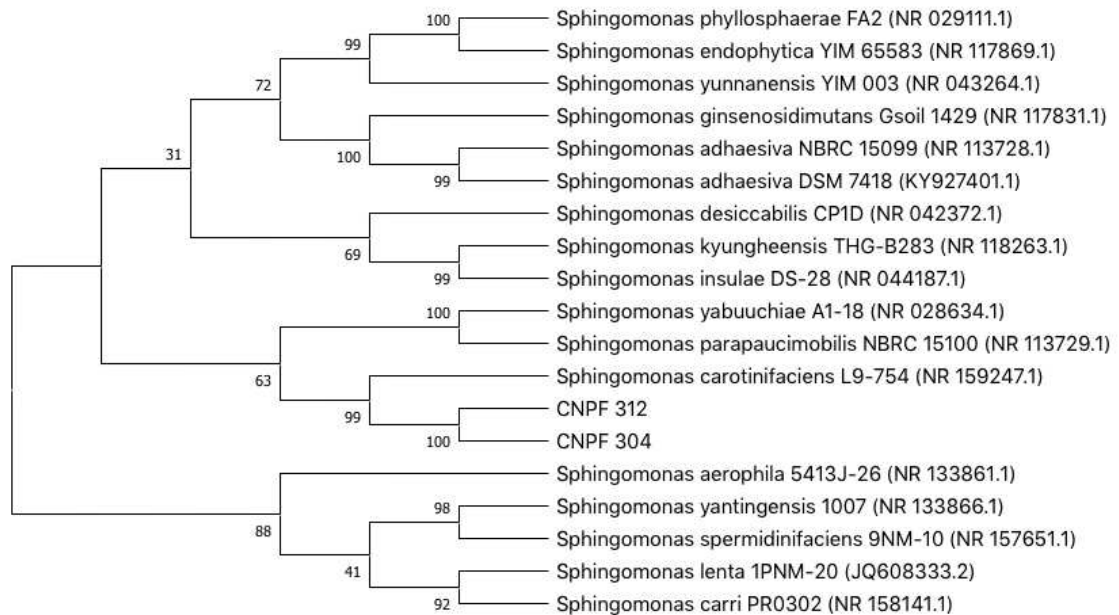


Fonte: Baldin (2021)

Para CNPF 304 e CNPF 312, agrupadas em um mesmo clado com nível de confiança de 100%, houve grande homologia com o gênero *Sphingomonas*. Esses isolados assemelham-se com *Sphingomonas carotinifaciens* L9-754 a 99% de nível de confiança e 63% para *Sphingomonas parapaucimobilis* NBRC 15100 e *Sphingomonas yabuuchiae* A1-18 (Figura 4).



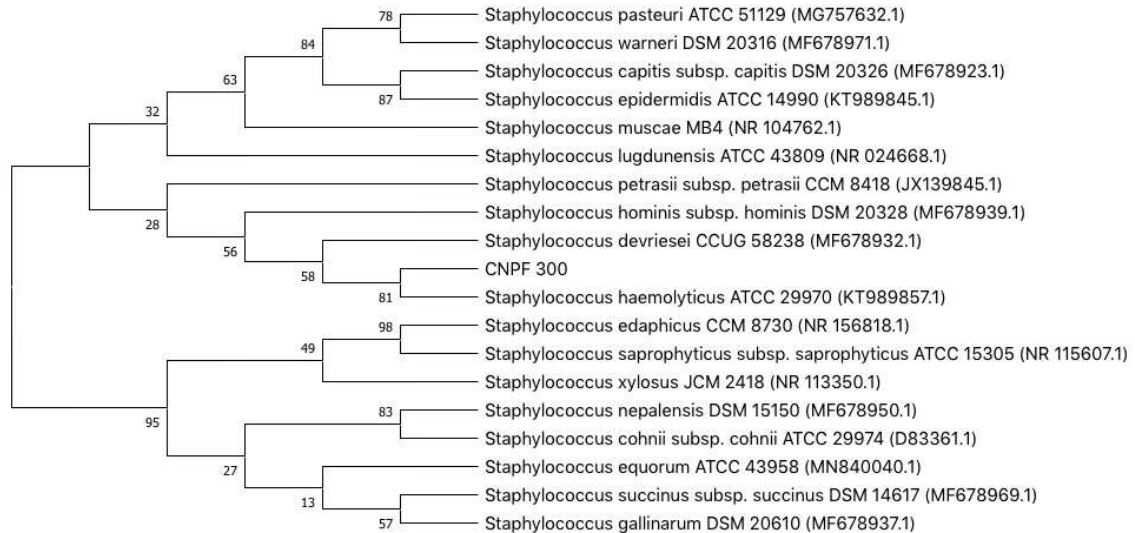
**FIGURA 4 –** ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Sphingomonas* E DOS ISOLADOS BACTERIANOS CNPF 304 E CNPF 312 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

O isolado bacteriano CNPF 300 exibiu significativa homologia com o gênero *Staphylococcus* e apresentou-se entre os 19 OTUs constituintes da árvore filogenética. A um nível de confiança de 81%, CNPF 300 assemelhou-se a *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, 58% a *Staphylococcus devriesei* CCUG 58238 e 56% a *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* DSM 20328 (Figura 5).

**FIGURA 5 –** ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A AFILIAÇÃO DO GÊNERO *Staphylococcus* E DO ISOLADO BACTERIANO CNPF 300 A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA OBTIDAS DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS ISOLADOS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

De acordo com Rodríguez e Fraga (1999), os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento em plantas são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter*. Tal informação corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde foram isoladas três bactérias com elevada homologia ao gênero *Pseudomonas*.

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, as quais possuem espécies denominadas como promotoras de crescimento vegetal, foram isoladas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) (Queiroz et al., 2020). Isolados bacterianos dos gêneros *Pseudomonas* e *Sphingomonas* também foram isolados em estudo conduzido por Ishizawa (2017), no qual foram isoladas 380 bactérias endofíticas de *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai, sendo identificados os gêneros *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Curtobacterium* e *Microbacterium*. Os mesmos dois gêneros foram isolados e identificados em trabalho realizado por Santana (2013), que visou a caracterização da comunidade bacteriana endofítica a partir de folhas e raízes de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*).

Bactérias endofíticas foram encontradas em tecidos foliares de *Citrus*, destacando-se as espécies: *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*,

*Burkholderia cepacia*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae* e *Methylobacterium extorquens* (Araújo et al., 2001). Em outro estudo, bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* foram predominantemente isoladas de raízes de alho da cultivar “Gigante Roxo” (Costa Júnior, 2018). Em estudo de Silva et al. (2015), as bactérias obtidas de cladódios de palmas apresentaram homologia com *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus pumilus* e *Methylobacterium radiotolerans*. Para Roesch et al. (2007), a análise filogenética demonstrou que a população de bactérias endofíticas associadas às plantas de milho abrange uma vasta gama de espécies: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri*, entre outras. Por fim, em estudo de Dos Santos (2008), isolados bacterianos foram extraídos de frutos de café (*Coffea arabica* L.), sendo identificados predominantemente do gênero *Burkholderia* e *Klebsiella*.

Entre os diferentes gêneros identificados, *Pseudomonas* (filo *Proteobacteria*) se constitui um dos mais importantes e tem sido relatado por diferentes autores como um dos principais gêneros com espécies bacterianas capazes de promover o crescimento vegetal, seja pela síntese de hormônios vegetais ou outros metabólitos secundários. São microrganismos gram-positivos, móveis, aeróbicos restritos e que apresentam grande potencial de colonização de raízes (Kloepper, 1993; Fonseca et al., 2000; Pereira et al., 2003; Freitas e Vildoso, 2004; Zarpelon, 2007; Vieira, 2015; Barroso, 2018). Há relatos por Chanway et al. (2000) de que bactérias *Pseudomonas* apresentaram incrementos tanto sobre a matéria seca quando sobre a altura de plantas de abeto híbrido (*Picea glauca x engelmannii*). Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas (1989), o qual detectou ganhos significativos em altura e massa seca em plântulas de cafeeiro inoculados com *Pseudomonas*; e por Brennecke et al. (2016), onde a inoculação bacteriana promoveu aumento das taxas de alongamento de colmo e do número de folhas por perfilho em *Brachiara decumbens* spp. A obtenção de bactérias do gênero *Pseudomonas* ocorreu também em folhas, raízes e rizomas da planta aquática *Typha domingensis* e apresentaram características de promoção do crescimento vegetal, como síntese de indóis e fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Barroso, 2018).

As bactérias do gênero *Acinetobacter* (filo *Proteobacteria*) são microrganismos de ocorrência comum em espécies vegetais, principalmente endogenamente. Apresentam-se, geralmente, no formato de cocobacilos, com caráter gram-negativo,

não móveis, aeróbicos e oxidase-negativos. São microrganismos não-patogênicos, embora algumas espécies causem sérias infecções em ambientes hospitalares (Krieg e Holt, 1984; Munoz-Price e Weinstein, 2008). Estudos de Suzuki et al. (2013) reportaram o isolamento de *Acinetobacter calcoaceticus* a partir de lentilha d'água (*Lemna aoukikusa*) e relataram efeitos benéficos na promoção do crescimento vegetal, principalmente aumentando o teor de clorofila. *A. calcoaceticus* foi isolada ainda a partir da rizosfera de cebolinha, demonstrando vários parâmetros de promoção de crescimento de plantas, como solubilização de fosfato, síntese de ácido indol-3-acético e produção de sideróforos (Zhao et al., 2014). Gulati et al. (2009) reportaram a presença de *A. rhizosphaerae* na rizosfera de *Hippophae rhamnoides*, a qual exibiu síntese positiva de auxina e solubilização de fosfatos, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento de ervilha, grão de bico, milho e cevada.

O gênero *Sphingomonas* (filó *Proteobacteria*) é constituído por bactérias gram-negativas, estritamente aeróbicas, com formato de bastão ou cocobacilos e com coloração amarelada das colônias bacterianas, devido à presença do carotenoide nostoxantina. Bactérias deste gênero são fixadoras de nitrogênio quando em associação com plantas não leguminosas (Videira, 2008; Santana, 2013). Granada et al. (2013), em um experimento conduzido com *Lupinus albus*, relataram que a inoculação com *Sphingomonas* sp. beneficiou o crescimento vegetal e incrementou os ganhos de massa seca de raízes e parte aérea. Os ganhos em crescimento podem estar relacionados à síntese de hormônios vegetais, como demonstrado por Paula (2018), onde bactérias do gênero *Sphingomonas* foram isoladas de raízes de sorgo e apresentaram resultados positivos para a fixação biológica de nitrogênio e síntese de IAA, destacando-se como uma possível bactéria promotora de crescimento em plantas. Semelhantemente, Khan et al. (2014) isolaram endofíticos do gênero em questão de folhas de *Tephrosia apollinea* e as caracterizaram como produtoras de IAA e giberelinas (GAs). Quando inoculadas em tomate (*Solanum lycopersicum*), *Sphingomonas* promoveram o aumento do comprimento das plântulas, massa fresca/seca da parte aérea, massa fresca/seca das raízes e conteúdo de clorofila (Khan et al., 2014).

Em relação ao gênero *Staphylococcus* (filó *Firmicutes*), as bactérias são gram-positivas e anaeróbicas facultativas, em formato de cocos predominantemente. A maioria das espécies descritas apresentam caráter virulento e patogênico (Ratti e Sousa, 2009; Barroso, 2018). Em estudo conduzido por Barroso (2018),

*Staphylococcus epidermidis* foi isolado de raízes da planta aquática *Typha domingensis* e não apresentou resultados positivos para a síntese de indóis e fixação biológica de nitrogênio (FBN), possivelmente não contribuindo para a promoção do crescimento vegetal. Resultados análogos foram encontrados por Vieira (2015), que obteve 2 espécies de *Staphylococcus* isoladas e identificadas de plantas de milho: *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus warneri*, ambas associadas a patologias humanas. Os isolados não apresentaram respostas positivas para a síntese de IAA, entretanto foram definidos como microrganismos solubilizadores de fosfato (Vieira, 2015).

A diversidade de bactérias endofíticas encontradas nos tecidos vegetais é um indicativo da complexidade do microbioma das plantas. Esses microrganismos podem atuar na promoção do crescimento vegetal e, geralmente, apresentam relações mutualísticas com as plantas hospedeiras. O reconhecimento entre bactérias simbiontes e plantas é determinado por meio de sinalizações químicas, como a liberação de exsudatos específicos, que são identificados pelas mesmas e permitem a entrada nos tecidos internos vegetais, geralmente pelas raízes. A colonização e o efeito na promoção de crescimento desses microrganismos são determinados, sobretudo, pelo genótipo das plantas. Isto é, algumas bactérias associativas demonstram modos de ação diferenciados conforme a espécie em que é empregada e/ou encontrada habitando os tecidos vegetais (Dixon e Kahn, 2004; Vieira, 2015; Zhu et al., 2016; Rozo, 2017).

Em síntese, representantes dos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* compreendem bactérias de interesse biotecnológico e que contribuem para a promoção do crescimento vegetal. A elucidação do modo de ação de bactérias promotoras de crescimento está cada vez mais iminente, uma vez que a agricultura sustentável necessita do emprego de bioinoculantes e, conseqüentemente, de maiores ganhos agrícolas (Freitas e Vildoso, 2004; Barroso, 2018).

### **3.3.3 Síntese de ácido Indol-3-acético por bactérias endofíticas**

Dentre os 39 isolados bacterianos obtidos, 36 estirpes foram utilizadas nesta análise devido a contratempos no crescimento bacteriano e composição dos inóculos. Foi observado que os 36 isolados bacterianos avaliados apresentaram a capacidade de produzir ácido indol-3-acético (IAA) *in vitro* após 48 horas de incubação, sendo

identificados por meio de reação colorimétrica com o reagente de Salkowski, que promoveu o aparecimento de coloração rosada nas amostras positivas para a síntese indólica, diferindo a intensidade conforme as concentrações de IAA presentes no meio. A produção de IAA variou entre 107,0 e 1055,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 2).

Através da análise de variância (ANOVA) foram observadas diferenças significativas em nível de 1% para a síntese de IAA entre os diferentes isolados bacterianos (Anexo 1). Sequencialmente, o teste de médias evidenciou a superioridade estatística dos isolados CNPF 317 (425,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CNPF 307 (1055,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a presença e ausência de L-triptofano, respectivamente.

A síntese de IAA ocorre em regiões meristemáticas vegetais e é sabido que inúmeros microrganismos são capazes de sintetizá-la, como demonstrado neste estudo (Spaepen et al., 2007; Paula, 2018). A síntese bacteriana de IAA ocorre por meio de seis diferentes vias metabólicas, dentre as quais cinco apresentam o triptofano como o principal precursor e uma é independente desse aminoácido. Algumas bactérias são capazes de realizar a síntese auxínica por duas ou mais vias, dependendo do seu ambiente de crescimento. As rotas de síntese dependentes de triptofano são: via do indol-3-acetamina (IAM), via do indol-3-piruvato (IPA), via da triptamina (TAM), via da oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) e via indol-3-acetonitrila (IAN) (Radwan et al., 2004; Spaepen et al., 2007; Baldotto et al., 2010; Mohite, 2013; Oliveira, 2016).

**TABELA 2 –** CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA) SINTETIZADO PELAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, *Azospirillum brasilense* 2083 e *Azospirillum brasilense* 2084 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO (100 mg L<sup>-1</sup>). Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	Produção de IAA (µg mL <sup>-1</sup> )	
	Presença de Triptofano	Ausência de Triptofano
Controle	0,00 e	0,00 d
<i>A. brasilense</i> 2083	192,6 bcde	233,7 bcd
<i>A. brasilense</i> 2084	255,9 abcd	460,3 bc
CNPF 293	199,2 abcde	538,1 bc
CNPF 294	175,9 bcde	213,7 bcd
CNPF 295	217,0 abcde	173,7 bcd
CNPF 296	342,6 abc	171,4 bcd
CNPF 297	253,7 abcd	205,9 bcd
CNPF 298	178,1 bcde	204,8 bcd
CNPF 299	254,8 abcd	243,7 bcd
CNPF 300	291,4 abcd	392,6 bcd
CNPF 301	290,3 abcd	499,2 bc
CNPF 302	181,4 bcde	158,1 bcd
CNPF 303	197,0 abcde	331,4 bcd
CNPF 304	335,9 abcd	351,4 bcd
CNPF 305	208,1 abcde	211,4 bcd
CNPF 307	331,4 abcd	1055,9 a
CNPF 308	272,6 abcd	409,2 bcd
CNPF 309	107,0 de	180,3 bcd
CNPF 310	200,3 abcde	313,7 bcd
CNPF 311	257,0 abcd	341,4 bcd
CNPF 312	264,8 abcd	193,7 bcd
CNPF 313	237,0 abcd	480,3 bc
CNPF 314	164,8 bcde	185,9 bcd
CNPF 315	205,9 abcde	243,7 bcd
CNPF 317	425,9 a	581,4 b
CNPF 318	219,2 abcde	219,2 bcd
CNPF 319	298,1 abcd	430,3 bcd
CNPF 320	132,6 bcde	130,3 cd
CNPF 321	353,7 ab	331,4 bcd
CNPF 322	231,4 abcd	472,6 bc
CNPF 323	177,0 bcde	264,8 bcd
CNPF 324	239,2 abcd	163,7 bcd
CNPF 325	173,7 bcde	237,0 bcd
CNPF 326	107,0 de	313,7 bcd
CNPF 327	214,8 abcde	238,1 bcd
CNPF 328	121,4 cde	184,8 bcd
CNPF 329	175,9 bcde	127,0 cd
CNPF 330	164,8 bcde	290,3 bcd

Fonte: Baldin (2021). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na rota do indol-3-acetamida, o aminoácido triptofano é convertido em IAM pela enzima triptofano-2-monooxigenase e, posteriormente, convertido em IAA pela IAM hidrolase. Essa rota foi identificada em inúmeras espécies do gênero *Pseudomonas*. Na via IPA, o triptofano é convertido em IPA através de uma transaminação mediada pela enzima aminotransferase, a qual é descarboxilada em indol-3-acetaldeído (IAAld) e oxidada, finalmente, em IAA. A síntese de IAA pela via IPA foi observada em várias bactérias, como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Enterobacter*. Na via TAM, identificada em bactérias do gênero *Bacillus* e *Azospirillum*, o triptofano é descarboxilado em triptamina, a qual é seguidamente convertida em IAA por uma aminaoxidase. A biossíntese por IAN ocorre através da conversão de do indol-3-acetonitrila em IAA por uma enzima nitrilase. Essa via foi identificada em *Agrobacterium* e *Rhizobium*. A via TSO foi identificada apenas em bactérias do gênero *Pseudomonas* e caracteriza-se pela conversão direta do triptofano em IAAld, evitando a formação de IPA. Na rota independente de triptofano, a qual ocorre quando não há adição deste aminoácido no meio de cultura, a síntese de IAA ocorre a partir do indol-3-glicerolfosfato ou indol (Radwan et al., 2004; Spaepen et al., 2007).

No presente trabalho, com a suplementação de triptofano, os controles positivos com *Azospirillum brasilense* registraram síntese de 192,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a estirpe 2083 e 255,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 2084, valores os quais foram superados consideravelmente pelos isolados CNPF 296, 300, 301, 304, 307, 308, 311, 312, 317, 319 e 321 (Tabela 2). Segundo Spaepen et al. (2007) e Oliveira (2016), a suplementação exógena de triptofano desempenha um papel crucial na modulação da biossíntese de IAA, principalmente por regular a expressão do gene *ipdC*, que codifica a enzima indol-3-piruvato descarboxilase. Este gene também pode ser modulado pela própria quantidade de IAA sintetizado e de seus intermediários de reação. Em muitos casos, o acréscimo de triptofano contribuiu para o aumento da produção de IAA em várias bactérias, como relatado em estudo conduzido por Baldotto et al. (2010).

Para a síntese de IAA sem a suplementação de triptofano no meio de cultura, CNPF 307 apresentou o maior valor registrado, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. CNPF 317 apresentou o segundo maior valor (581,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido de CNPF 293 (538,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). *A. brasilense* 2083 e 208 apresentaram, na devida ordem, 233,7 e 460,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de IAA. De modo geral, foi possível observar que a



ausência de triptofano ocasionou um aumento na síntese de IAA em 25 dos 36 isolados bacterianos. Tal comportamento também foi verificado nos tratamentos controles positivos com as estirpes 2083 e 2084 de *Azospirillum brasilense* (Tabela 2). Esses resultados indicam que os isolados bacterianos avaliados realizam a síntese auxínica predominantemente pela via independente de triptofano, apresentando resultados positivos, embora inferiores, também na presença deste aminoácido. Contudo, a via independente do L-triptofano torna-se desejável na composição de inoculantes bacterianos, uma vez que possibilita a seleção de microrganismos com provável potencial para a promoção do crescimento vegetal sem que haja, necessariamente, a presença deste aminoácido na composição dos bioinoculantes.

Resultados similares foram registrados em estudo de Mariosa et al. (2017), no qual dois isolados bacterianos apresentaram os maiores valores de produção de IAA (1406,46 e 719,14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na ausência de triptofano, em contraposição às menores produções (199,80 e 270,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). No mesmo estudo, *Azospirillum amazonense* sintetizou 522,46  $\mu\text{g IAA mL}^{-1}$ , valor próximo ao obtido no presente estudo para *Azospirillum brasilense* 2084 na ausência de triptofano (460,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Conforme Mirza et al. (2001), a síntese de indóis por microrganismos é bastante variável entre espécies e, até mesmo, entre estirpes diferentes de uma mesma espécie.

O primeiro relato da ocorrência da via de biossíntese de IAA independente de triptofano em bactérias foi descrito por Prinsen et al. (1993), a partir de análises cromatográficas (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) realizadas com *Azospirillum brasilense*. Este relato corrobora com os resultados dos controles positivos com *A. brasilense* obtidos no presente estudo, os quais apresentaram valores superiores de IAA na carência de L-triptofano, em relação a presença do mesmo, respectivamente: para a estirpe 2083 – 233,7 e 192,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e para a estirpe 2084 – 460,3 e 255,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Na literatura atual são encontrados escassos relatos de microrganismos que sintetizam IAA por vias independentes do L-triptofano, sendo inexistentes estudos que descrevam e confirmem os genes e enzimas envolvidos neste processo, levando alguns autores a questionar a existência de fato dessa via (Li et al., 2018; Cruz, 2021). Em estudo de Li et al. (2018) foi verificado que a bactéria *Arthrobacter pascens* ZZ21 apresentou-se apta a sintetizar IAA na ausência de L-triptofano, indicando que a mesma realiza a via de síntese de IAA independente deste aminoácido. Tais resultados assemelham-se com os obtidos neste estudo, no qual a grande maioria dos

isolados de *P. caribaea* var. *hondurensis* realizam preferencialmente a síntese indólica na falta deste composto. Uma vez que não há descrições detalhadas e fidedignas dos processos bioquímicos que intercedem a síntese auxínica por essa rota, há suposições de que as bactérias podem apresentar a capacidade de síntese de triptofano como um precursor endógeno ou até mesmo utilizam o L-triptofano presente em exsudatos das plantas ou no ambiente rizosférico para o desencadeamento de rotas dependentes.

Em estudo de Mirza et al. (2001), no qual foi semelhantemente analisada a síntese microbiana de IAA na presença e ausência do aminoácido triptofano, foi observado que as bactérias do gênero *Enterobacter* sintetizaram quantidades consideráveis de IAA em meio de crescimento sem o acréscimo de triptofano. Entretanto, as quantidades de IAA foram consideravelmente superiores em meio suplementado com triptofano, indicando a necessidade desse precursor para a biossíntese de indóis, com concentrações variando de 94,7 a 2211  $\mu\text{g L}^{-1}$  de IAA. Para Ertuck et al. (2010), bactérias do gênero *Bacillus* sintetizaram IAA, preferencialmente, por rotas dependentes do aminoácido triptofano, alcançando uma superioridade significativa quando houve o acréscimo do mesmo ao meio de cultura.

Foi observado em estudo de Queiroz et al. (2020) que o isolado bacteriano do gênero *Bacillus* sp. apresentou elevada produção de compostos indólicos na ausência do aminoácido L-triptofano (27,41  $\mu\text{g L}^{-1}$  de IAA), sendo observado um valor três vezes maior que o obtido por *Azospirillum brasilense* (9,35  $\mu\text{g L}^{-1}$  de IAA), utilizado como controle devido a sua produção significativa de IAA. Semelhantemente, isolado de *Pseudomonas* sp. alcançou valor superior a *A. brasilense*, com produção de 12,79  $\mu\text{g L}^{-1}$  de IAA.

Vale ressaltar, em um âmbito geral, que microrganismos que apresentam biossíntese reduzida de IAA *in vitro*, como observado neste estudo, podem ocasionar efeitos benéficos à promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas mesmo que em pequenas concentrações, pois mesmo em dosagens inferiores, as auxinas promovem efeitos fisiológicos positivos. Contrariamente, elevadas concentrações desse hormônio vegetal podem desencadear efeitos inibitórios e tóxicos às células vegetais (Oliveira, 2016; Paula, 2018). Em estudo de Schlindwein et al. (2008), foi constatado que altas concentrações sintetizadas de IAA em meio acrescido de triptofano foram danosas ao crescimento de raízes em alface, indicando que menores

concentrações são mais eficientes na promoção do crescimento e desenvolvimento radicular.

Em síntese, a inoculação de tecidos vegetais com bactérias promotoras de crescimento em plantas, as quais possuem em sua grande maioria a capacidade de biossíntese de IAA, pode proporcionar um encadeamento de eventos fisiológicos e benefícios no desenvolvimento e crescimento das plantas, seja em condições *in vitro* ou em campo. Dentre tais benefícios, citam-se a melhora nas taxas de enraizamento, aumento dos índices de germinabilidade de sementes e contribuição para o desenvolvimento de parte aérea e radicular mais vigorosas.

### 3.4 CONCLUSÕES

Nas presentes condições de desenvolvimento deste trabalho pode-se concluir que:

- Explantes *in vitro* de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, mantidos há três anos em condições *in vitro*, apresentaram significativa colonização endofítica, sendo isoladas 39 estirpes bacterianas.
- As populações de bactérias endofíticas isoladas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* apresentam variado perfil genotípico e fenotípico, sendo identificados, dentre as onze estirpes analisadas, os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*.
- Os isolados CNPF 307 e CNPF 317 apresentaram superioridade na síntese de indóis, registrando os maiores valores de IAA observados na ausência ou presença do aminoácido L-triptofano.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, J. **Produção de ácido indol acético *in vitro* por *Torulaspota globosa***. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados), Universidade Federal de São Carlos, 2017, 68 p.
- ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ASSUMPÇÃO, L. de C. **Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e seu potencial biotecnológico**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, 2008, 93 p.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.
- BARBOSA, E. C. **Isolamento de microrganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (malva-do-campo) e avaliação de seu potencial enzimático e antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Goiás, 2005, 84 p.
- BARROSO, L. M. **Interação de planta aquática e microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2018, 77 p.
- BRENNECKE, K.; BERTIPAGLIA, L. M. A.; ANTONIAZZI, A.; SOUZA, E. F. Inoculação da bactéria *Pseudomonas fluorescens* no índice de crescimento da *Brachiaria decumbens* spp. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 14, p. 217-224, 2016.
- CASTRO, P. R. C. Mecanismo de Ação Auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 36, p. 621-634, 1979.
- CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.
- COSTA JÚNIOR, P. S. P. **Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de raízes de alho e caracterização da promoção de crescimento em meristemas micropropagados**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, 2018, 80 p.

CRUZ, T. A. da. **O papel da via do indol-3-piruvato na produção de ácido indol-3-acético e promoção do crescimento vegetal pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, 2021, 74 p.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, 2004.

DOS SANTOS, T. M. A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.).** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2008, 129 p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.

ERTUCK, 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. **Biological Research**, v. 43, p. 91-98, 2010.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) Influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.

FONSECA, M. C. C. da; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. de B.; CÂMARA, A. de F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado Técnico**, n. 43, p. 1-4, Embrapa Agrobiologia, 2000.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, p. 31-34, 1989.

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

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

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R. C. Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas. **Current Microbiology**, v. 58, p. 371-377, 2009.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. van.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

ISHIZAWA, T. A. **Microrganismos endofíticos e associados de melancia e aplicação biotecnológica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Tocantins, 2017, 111 p.

JOHNSON, J.C.; SPAKOWICZ, D. J.; HONG, B.; PETERSEN, L. M.; DEMKOWICZ, P.; CHEN, L.; LEOPOLD, S. R.; HANSON, B. M.; AGRESTA, H. O.; GERSTEIN, M.; SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G. M. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature Communications**, v. 10, n. 5029, 2019.

KHAN, A. L.; WAQAS, M.; KANG, S. M.; AL-HARRASI, A.; HUSSAIN, J.; AL-RAWAHI, A.; AL-KHIZIRI, S.; ULLAH, I.; ALI, L.; JUNG, H.Y.; LEE, I. J. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689-695, 2014.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KLOEPPER, J.W. **plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents**. Metting F.B. Ed. Soil Microbial Ecology, New York, Marcel Dekker, p. 225-274, 1993.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1984.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, John Wiley and Sons, New York, 115-175, 1991.

LI, M.; GUO, R.; YU, F.; CHEN, X.; ZHAO, H.; LI, H. WU, J. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 443, 2018.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARIOSIA, T. de N.; MELLONI, E. G. P.; MELLONI, R.; FERREIRA, G. M. dos R.; DE SOUZA, S. M. P.; DA SILVA, L. F. de O. Rizobactérias e desenvolvimento de mudas a partir de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 60, n. 4, p. 302-306, 2017.

MIGUEL, P. S. B.; DELVAUX, J. C.; DE OLIVEIRA, M. N. V.; DE CAMARGO, R.; FRANCO, M. H. R.; SOBREIRA, H. A.; SOARES, D. F.; JARDIM, V. H. P. Bactérias endofíticas: colonização, benefícios e identificação. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 8777-8791, 2021.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, v. 237, p. 47-54, 2001.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. Acinetobacter infection. **The new England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1271-1281, 2008.

OLIVEIRA, M. de S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal**. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás, 2016, 102 p.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 487-508, 2017.

PAULA, T. de A. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas ao sorgo**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, 2018, 51 p.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 5, p. 609-615, 1993.

QUEIROZ, E. G.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN, M.; DA SILVA, K. Endophytic bacteria associated with tissue culture and leaves of *Plinia peruviana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.



RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 9-16, 2009.

RIBEIRO, A. S.; PAMPHILE, J. A. Microrganismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista UNINGÁ Review**, v. 29, n. 3, p. 88-93, 2017.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

ROZO, F. A. M. **Isolamento, caracterização e seleção de bactérias diazotróficas em tomateiro**. Dissertação (Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários), Universidade Federal de Viçosa, 2017, 86 p.

SAKIYAMA, C. C. H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2001, 80 p.

SANTANA, R. S. M. de. **Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de *Baccharis dracunculifolia*, com e sem galha causada por *Baccharopelma dracuncufoviae***. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Minas Gerais, 2013, 77 p.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SILVA, M. de O.; FREIRE, F. J.; LIRA JUNIOR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; DA COSTA, D. P.; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar e áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1113-1121, 2012.

SILVA, M. L. R. B. da; FIGUEIRÔA, C. dos S.; MERGULHÃO, A. C. do. E. S.; LYRA, M. do C. C. P. de. Identificação de bactérias diazotróficas isoladas em cultivares de palma (*Opuntia* e *Nopalea*) usando o gene *recA*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 2, p. 577-583, 2015.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, v. 31, p. 425-448, 2007.

SPASSIN, A. C. **Avaliação de bactérias como promotoras de crescimento e enraizamento de mudas de *Eucalyptus* spp. sob diferentes formas de dispensa**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), 2014.

SUZUKI, W.; SUGAWARA, M.; MIWA, K.; MORIKAWA, M. Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 10, n. 10, p. 1-4, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**. 6. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017, 858 p.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, 1994.

VAZ, L. A. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* como promotoras de crescimento vegetal e no controle de pragas em diferentes culturas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, 2014, 107 p.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008, 140 p.

VIEIRA, R. S. **Aplicação de rizobactérias e bactérias endofíticas para promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012, 64 p.

VIEIRA, J. A. C. **Bactérias endofíticas de milho e seu potencial como promotoras de crescimento vegetal e agentes de controle biológico**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, 2015, 147 p.

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus<sup>®</sup> no enraizamento e crescimento de eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, 2007, 82 p.

ZHAO, L.; WANG, F.; ZHAO, J. Identification and functional characteristics of chlorpyrifos-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 457- 463, 2014.

ZHU, S.; VIVANCO, J. M.; MANTER, D. K. Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 324-333, 2016.

## 4 CAPÍTULO II: GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. IN VITRO COM A APLICAÇÃO DE INOCULANTES MICROBIANOS

### RESUMO

A germinação é uma sucessão de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos e internos às sementes. Dentre as principais condições que afetam a germinação citam-se: luz, água, temperatura, oxigênio, dormência e microrganismos. A inoculação de sementes com bactérias associativas e promotoras de crescimento é um mecanismo auspicioso no alcance de altas taxas de germinabilidade e produção de plantas bem desenvolvidas. A associação destas bactérias com outros promotores de germinação como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), utilizado para a superação de dormência tegumentar, podem contribuir positivamente no desempenho germinativo. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* e *Azospirillum brasilense* na germinação de sementes de *Pinus taeda* L. Foram realizados três experimentos. No primeiro experimento, as sementes foram inoculadas *in vitro* com  $H_2O$ ,  $H_2O_2$  e 38 estirpes bacterianas. No segundo, as sementes foram tratadas com inóculos bacterianos de 11 estirpes selecionadas,  $H_2O$  e  $H_2O_2$ . No último ensaio, as sementes foram tratadas com  $H_2O$ ,  $H_2O_2$ , *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084. Foi realizada a contagem do número de sementes germinadas diariamente e, após 45 dias, foi calculada a porcentagem de sementes germinadas, não germinadas, com germinação incompleta, tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e frequência relativa de germinação (Fr). A imersão das sementes em água destilada estéril por 48 horas não foi eficaz na germinação de *Pinus taeda* L. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) favoreceu o percentual de sementes germinadas, aumento do IVG e diminuição do TMG. A inoculação com as bactérias endofíticas promoveu, em grande parte, incrementos numéricos em percentual de sementes germinadas em relação ao  $H_2O_2$ . As estirpes bacterianas CNPF 300, CNPF 304, CNPF 305, CNPF 309, CNPF 320 e CNPF 328 foram eficientes no incremento da germinabilidade de sementes de *P. taeda* L. A inoculação de *Azospirillum brasilense* promoveu ganhos numéricos em germinação e IVG, diminuição do TMG e obtenção de mudas mais vigorosas, com raízes mais longas e maior altura comparada aos tratamentos com  $H_2O_2$  e  $H_2O$ . Em suma, a aplicação de peróxido de hidrogênio atuou eficientemente na superação da dormência tegumentar e a microbiotização beneficiou a germinação de sementes de *Pinus taeda* L.

Palavras-chave: dormência tegumentar, bactérias endofíticas, *Azospirillum brasilense*

## ABSTRACT

Germination is a succession of physiological events influenced by external and internal factors. Among the main conditions that affect germination are: light, water, temperature, oxygen, dormancy and microorganisms. The inoculation of seeds with associative and growth-promoting bacteria is an auspicious tool in achieving high rates of germination and conquest of well-developed plants. Associated with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), used to overcome integumentary dormancy, these bacteria can contribute positively to the germination performance. Thus, this study aimed to evaluate the effect of endophytic bacteria isolated from *Pinus caribaea* var. *hondurensis* tissues and *Azospirillum brasilense* on seed germination of *Pinus taeda* L. Three experiments were realized. In the first experiment, the seeds were inoculated *in vitro* with  $H_2O$ ,  $H_2O_2$  and 38 endophytic bacterial strains. In the second, the seeds were treated with inoculants of 11 selected bacterial strains,  $H_2O$  and  $H_2O_2$ . In the last experiment, the seeds were treated with  $H_2O$ ,  $H_2O_2$ , *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084. Germinated seeds were evaluated daily and after 45 days was calculated the percentage of germinated and non-germinated seeds, incomplete germination, average germination time (AGT), germination speed index (GSI) and relative germination frequency (Fr). Seed immersion in distilled water for 48 hours was not effective in the germination of *Pinus taeda* L. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) favored the percentage of germinated seeds, reached higher GSI and lower AGT. Inoculation with endophytic bacteria promoted, in the most part, numerical increments in seeds germinated in relation to  $H_2O_2$ . The bacterial strains CNPF 300, CNPF 304, CNPF 305, CNPF 309, CNPF 320 and CNPF 328 were efficient in increasing the germinability of *P. taeda* L. seeds. The *Azospirillum brasilense* inoculation promoted numerical gains in germination, reached higher GSI, lower AGT and more vigorous seedlings, with longer roots and higher height compared to  $H_2O_2$  and  $H_2O$ . In the end, the application of hydrogen peroxide acted efficiently in overcoming tegumentary dormancy and microbionization benefited the germination of *Pinus taeda* L. seeds.

Keywords: integumentary dormancy, endophytic bacteria, *Azospirillum brasilense*

## 4.1 INTRODUÇÃO

Visando a sustentabilidade e rentabilidade do processo silvicultural de *Pinus taeda* L., torna-se cada vez mais fundamental o plantio de florestas que alcancem elevadas taxas de produtividade. Para isso, tendo em consideração que a grande maioria desses plantios resulta de propagação sexuada, é necessária a obtenção de sementes com alta qualidade fisiológica e genética, e um vasto conhecimento sobre o processo germinativo de cada espécie, a fim de alcançar bons índices de germinação (Golle, 2007; Rego et al., 2011).

A germinação é um fenômeno fisiológico e morfológico complexo, considerado fisiologicamente como a retomada do crescimento do embrião, alongamento do eixo embrionário e protrusão da radícula através do rompimento do tegumento das sementes. Detalhadamente, após a embebição da semente, ocorre a absorção de água pela mesma, promovendo o entumescimento e o amolecimento do tegumento hidratado. Os tecidos de crescimento se desenvolvem, a radícula e os cotilédones emergem, as folhas iniciam o seu desenvolvimento e a plântula se torna, pouco a pouco, autossuficiente fotossinteticamente (Golle, 2007; Alencar, 2009; Marques et al., 2014).

Determinadas espécies vegetais precisam ser submetidas a processos específicos para que ocorra a germinação, os quais visam superar a dormência das sementes, amolecer o tegumento ou fornecer água ao embrião. A dormência é caracterizada pela incapacidade e/ou bloqueio da germinação das sementes, mesmo quando expostas a ambientes favoráveis ao processo germinativo. Pode ser de caráter físico (impermeabilidade do tegumento à água), químico (substâncias inibidoras), mecânico (resistência do tegumento), morfológico (imaturidade do embrião) e fisiológico (aspectos fisiológicos que diminuem a germinação, como hormônios vegetais). Dentre os métodos mais utilizados para a superação da dormência e emergência das plântulas a partir da absorção de água pelas sementes estão a escarificação química e mecânica, estratificação fria e quente-fria, choque térmico, exposição à luz intensa, imersão em água quente e embebição em água fria (Floriano, 2004; Golle, 2007).

No caso de sementes de *Pinus taeda* L., recomenda-se, para a superação da dormência tegumentar, a imersão em água por um período de 24 horas e 50 dias a baixas temperaturas (0 a 5°C) (Floriano, 2004). Segundo o Relatório de Análise de

Sementes (Brasil, 2009), a realização do teste de germinação para *Pinus taeda* L. deve ser realizado em recipiente contendo papel, com alternância de temperatura entre 20°C por 16 horas e 30°C por 8 horas (escarificação), com início e término no sétimo e vigésimo oitavo dia, respectivamente. Quisen e Degenhardt-Goldbach (2020) alegam que, para *Pinus* spp. e outras espécies de coníferas com elevado grau de dormência tegumentar, a aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na escarificação de sementes, em uma concentração igual ou superior a 40 volumes, proporciona uma melhora significativa no desempenho germinativo. Assim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser empregado rotineiramente em viveiros comerciais para a produção de mudas florestais, pois sua metodologia de aplicação é de fácil execução e replicabilidade.

O conhecimento e o controle dos fatores ambientes envolvidos no processo germinativo permitem otimizar a quantidade, a velocidade e a uniformidade da germinação e, por conseguinte, a produção de mudas mais vigorosas e com menor custo. Os principais fatores ambientais que influenciam nesse processo são: luz, temperatura, umidade, oxigênio, substâncias químicas, nutrientes, meio de crescimento, recipiente de germinação e microrganismos (Floriano, 2004; Alencar, 2009; Marques et al., 2014).

A inoculação de sementes com bactérias promotoras de crescimento em plantas apresenta-se, atualmente, como uma ferramenta promissora no alcance de altas taxas de germinação e obtenção de plantas mais vigorosas e bem desenvolvidas (Ogawa e Iwabuchi, 2001; Çavusoglu e Kabar, 2010). Essa capacidade de estimular o crescimento vegetal e beneficiar o desenvolvimento pós germinativo apresentada por esses microrganismos é atribuída, principalmente, à sua síntese de hormônios vegetais, como auxinas, citocininas, etileno e giberelinas, além do aumento da absorção de água e nutrientes. Por demais, outros mecanismos fornecem benefícios ao crescimento vegetal, como a produção de sideróforos e/ou metabólitos secundários e fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Mariano et al., 2004; Santos e Varavallo, 2011).

Bactérias do gênero *Azospirillum*, com destaque para a espécie *A. brasilense*, são encontradas em associação com culturas agrícolas importantes no cenário mundial, como milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar (Matoso, 2017). Estas são, rotineiramente, constituintes de bioinoculantes comerciais, pois atuam na promoção do crescimento vegetal através da FBN, síntese de compostos indólicos, citocininas e giberelinas, solubilização de fosfato, aumento dos teores de clorofila e condutância

estomática, acarretando em ganhos no rendimento e consequente produtividade dos plantios (Costa et al., 2015; Mumbach et al., 2017).

As bactérias endofíticas, isoladas de tecidos celulares internos, estão entre os microrganismos mais amplamente empregados em estudos de microbiotização, pois são aptas a penetrar e colonizar os tecidos das plantas sistemicamente, promovendo alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Em sementes, essas bactérias podem penetrar o tegumento e atuar diretamente sobre células e tecidos em formação ou agir sobre a plântula emergida, ocasionando respostas físicas e bioquímicas nas plantas (Santos e Varavallo, 2011; Vaz, 2014). Entretanto, embora a eficiência da inoculação desses microrganismos seja verificada em vastos estudos, nas mais diversas espécies vegetais, as respostas fisiológicas geradas por estes podem ser influenciadas por vários fatores, como a quantidade e qualidade dos bioinoculantes, estirpes bacterianas utilizadas na inoculação, interação das bactérias inoculadas com a microbiota nativa das plantas e, principalmente, o método de inoculação realizado (Matsumura et al., 2015; Cordeiro, 2017).

Diante do apresentado, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de *Azospirillum brasilense* e isolados de bactérias endofíticas isoladas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* sobre a germinação de sementes de *Pinus taeda* L.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com *Azospirillum brasilense*

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e Laboratório de Microbiologia dos Solo da Embrapa Florestas, Colombo (PR), entre os meses de junho e julho de 2019. As sementes utilizadas são provenientes de material de segunda geração (ano 2018), obtidas da empresa Westrock.

O material vegetal referente ao tratamento controle com água destilada (T1) foi constituído de sementes submetidas à imersão em H<sub>2</sub>O por 48 horas sob agitação constante a 75 rpm, sendo posteriormente submetido a desinfestação com álcool 70° por 60 segundos e solução de hipoclorito de sódio a 3% por 15 minutos, seguido de seis lavagens com água destilada estéril. O T2 constituiu o segundo tratamento controle utilizado neste estudo, representado por sementes de *P. taeda* imersas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 40 volumes por 60 minutos, com a finalidade de desinfestação e superação da dormência tegumentar. Para os demais tratamentos, foi realizada a imersão das sementes em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, após repetidas lavagens com água estéril, inoculação com as estirpes de *Azospirillum brasilense*. As sementes de *P. taeda* L. utilizadas foram obtidas da empresa Westrock e encontravam-se armazenadas em refrigerador a temperatura de 4°C por aproximadamente 45 dias.

As estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense*, pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas e denominadas 2083 e 2084, foram repicadas para o meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico; 15 g L<sup>-1</sup> ágar) e colocadas em estufa de crescimento por 48 horas, sendo posteriormente subcultivadas para o meio DYG's líquido (sem a adição de ágar). Os inóculos bacterianos permaneceram por 48 horas no shaker, a uma temperatura de 28±2°C e agitação a 150 rpm. A inoculação foi realizada misturando-se as sementes de cada tratamento (T) com 1 mL do inóculo bacteriano, sendo então transplantadas em caixas gerbox. O estudo ocorreu conforme descrito abaixo:

T1 – tratamento controle com imersão em água destilada por 48 horas;

T2 – tratamento controle com imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos;

T3 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe 2083;  
 T4 - imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe 2084;  
 T5 - imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *Azospirillum brasilense* 2083 e de *Azospirillum brasilense* 2084.

O ensaio de germinação foi conduzido em caixas gerbox contendo três folhas de papel filtro estéril e umedecidas com 3 mL água destilada estéril, e mantidas em sala de crescimento com temperatura de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas. Diariamente foi realizada a contagem do número de sementes germinadas (protrusão radicular de 2-3 mm), sendo que ao final de 45 dias, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas (radícula maior que 2 mm), sementes não germinadas, sementes com germinação incompleta (protrusão da radícula com pouco desenvolvimento), tempo médio de germinação (TMG) (Labouriau, 1983), índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962) e frequência relativa de germinação (Fr) (Labouriau e Valadares, 1976).

O tempo médio de germinação foi calculado através da equação proposta por Labouriau (1983):

$$TMG = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i,$$

onde  $n_i$  é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo  $t_i$ , representando cineticamente o tempo necessário para um conjunto de sementes germinar.

O índice de velocidade de germinação (IVG) representa o número de sementes emergidas diariamente e é calculado pela equação proposta por Maguire (1962):

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + G_n/N_n,$$

onde G representa o número de sementes germinadas, N representa o número de dias após a semeadura.

O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições de 40 sementes por unidade experimental (caixa gerbox). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Bartlett e as médias comparadas ao nível de 5% de

probabilidade pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas no software Assisat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

#### **4.2.2 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com 38 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis***

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas, Colombo (PR), entre os meses de março e abril de 2020.

Para a inoculação das sementes de *Pinus taeda* L. foram preparadas 38 soluções de bactérias endofíticas isoladas dos tecidos vegetais de *P. caribaea* var. *hondurensis*. Essas bactérias armazenadas em glicerol e óleo mineral foram repicadas para meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico; 15 g L<sup>-1</sup> ágar), permanecendo em estufa de crescimento por 48 horas a 28±2°C. Posteriormente, as colônias isoladas foram repicadas para o meio DYG's líquido (sem a adição de ágar) e colocadas em shaker por 48 horas, com temperatura de 28±2°C e agitação a 150 rpm.

As sementes de *P. taeda* encontravam-se armazenadas em temperatura de aproximadamente 4°C por aproximadamente 45 dias. Para o primeiro tratamento controle (T1), as sementes foram submetidas à imersão em água destilada por 48 horas sob agitação constante a 75 rpm e, posteriormente, desinfestadas com álcool 70° por 60 segundos e solução a 3% de hipoclorito de sódio por 15 minutos, com seis lavagens consecutivas com água destilada estéril. O segundo tratamento controle (T2) foi constituído por sementes imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 40 volumes por 60 minutos, visando a assepsia do material vegetal e superação da dormência tegumentar. Os demais tratamentos contaram com a imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, após enxágues seguidos com água destilada estéril, aplicação dos inóculos bacterianos. O inóculo foi aplicado às sementes misturando-se 500 µL da solução bacteriana em tratamento, sendo então semeadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada estéril e

seladas com filme plástico. A organização dos tratamentos ocorreu da seguinte maneira:

T1 – tratamento controle com imersão em água por 48 horas;

T2 – tratamento controle com imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos;

T3 até T40 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação, respectivamente, com os isolados bacterianos pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas, identificados como CNPF 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330 e 331.

O ensaio foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas. O controle do número de sementes germinadas foi realizado diariamente, considerando como germinada a semente com protrusão radicular maior que 2 mm. Decorridos 45 dias, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas (radícula maior que 2 mm), sementes não germinadas, sementes com germinação incompleta (definida pela protrusão da radícula com pouco desenvolvimento), tempo médio de germinação (TMG) (Labouriau, 1983), índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962) e frequência relativa de germinação (Fr) (Labouriau e Valadares, 1976).

O ensaio em questão foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 40 tratamentos e 4 repetições cada, contendo 10 sementes por unidade experimental (placa de Petri). Os resultados obtidos foram analisados quanto à variância pelo teste de Bartlett e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

#### **4.2.3 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com 11 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis***

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas, Colombo (PR) entre os meses de dezembro de 2020 e janeiro de 2021, com sementes de *Pinus taeda* L. que

se encontravam armazenadas em refrigerador com temperatura de aproximadamente 4°C.

Foram selecionadas onze estirpes bacterianas endofíticas de *P. caribaea* var. *hondurensis*, conforme os melhores resultados obtidos em estudos de germinação anteriormente realizados. As estirpes encontravam-se armazenadas em glicerol e óleo mineral, sendo necessário o repique para o meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico; 15 g L<sup>-1</sup> ágar) e crescimento em estufa por 48 horas a 28±2°C. Posteriormente, colônias isoladas foram repicadas para meio DYG's líquido (sem adição de ágar) e postas para crescer em shaker por 48 horas, com temperatura de 28±2°C e agitação a 150 rpm.

As sementes do primeiro tratamento controle (T1) foram submetidas à imersão em água destilada por 48 horas sob agitação constante de 75 rpm e, posteriormente, desinfestadas com álcool 70° por 60 segundos e solução de hipoclorito de sódio 3% por 15 minutos. T2 constituiu o segundo tratamento controle, sendo as sementes imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 40 volumes por 60 minutos. Para o restante dos tratamentos, as sementes foram imersas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e seguidas da inoculação com as bactérias endofíticas.

A inoculação foi realizada misturando-se 500 µL da solução bacteriana às sementes de cada tratamento, sendo então semeadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo três folhas de papel filtro em cada, umedecidas com água destilada estéril. A organização dos tratamentos ocorreu da seguinte maneira:

- T1 – tratamento controle com imersão em água por 48 horas;
- T2 – tratamento controle com imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos;
- T3 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 297;
- T4 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 300;
- T5 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 303;
- T6 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 304;
- T7 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 305;
- T8 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 307;
- T9 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 311;
- T10 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 312;
- T11 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 314;

T12 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 317;

T13 – imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação com a estirpe CNPF 321.

O ensaio foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas. A contagem do número de sementes germinadas foi realizado diariamente, sendo considerada germinada a semente com protrusão radicular maior que 2 mm. Decorridos 30 dias, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas (radícula maior que 2 mm), não germinadas, com germinação incompleta (definida pela protrusão da radícula com pouco desenvolvimento), tempo médio de germinação (TMG) (Labouriau, 1983), índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962) e frequência relativa de germinação (Fr) (Labouriau e Valadares, 1976).

O ensaio em questão foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 13 tratamentos e 4 repetições cada, contendo 10 sementes por unidade experimental (placa de Petri). As variáveis estudadas foram analisadas quanto à variância pelo teste de Bartlett e as médias dos resultados obtidos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com *Azospirillum brasilense*

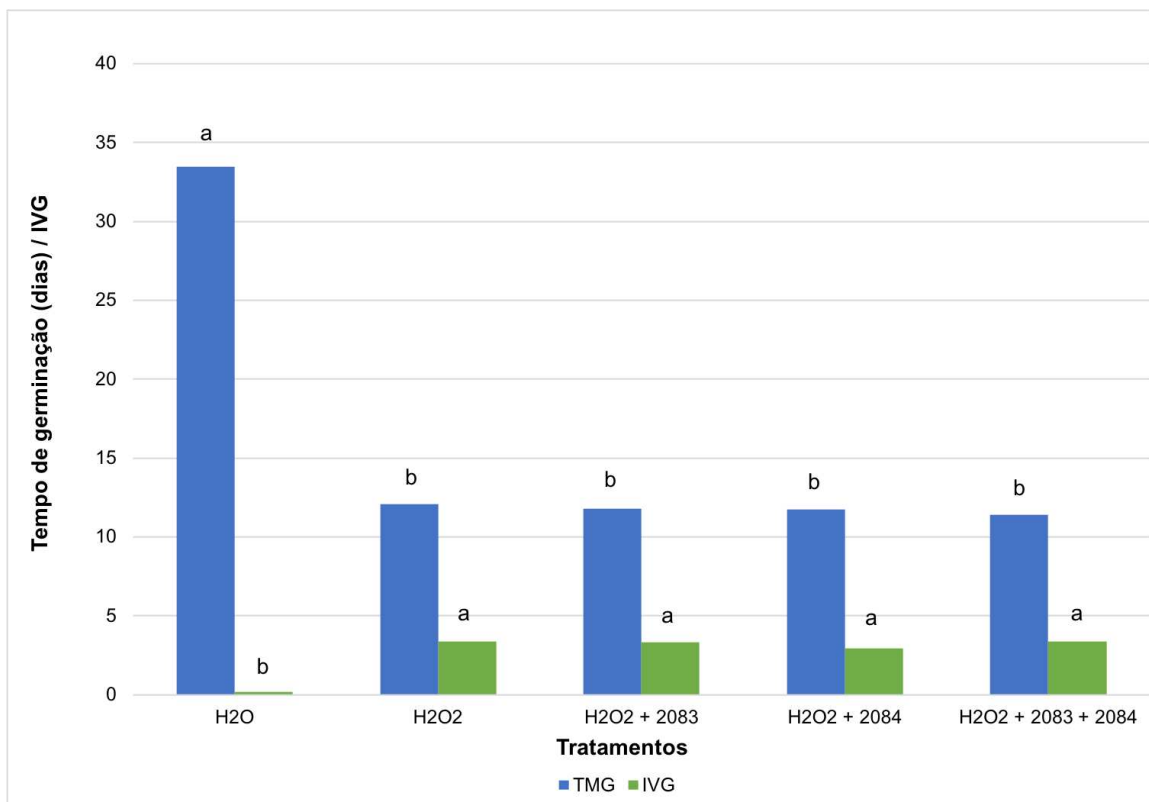
Neste experimento foram empregados dois tratamentos controles: o primeiro (T1) refere-se às sementes imersas em água destilada estéril por 48 horas e, o segundo (T2), às sementes imersas em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 60 minutos. Ambos os tratamentos foram considerados nas análises estatísticas, uma vez que foram observadas sementes germinadas dentro dos 45 dias em que as variáveis foram avaliadas. Como relatado por Floriano (2004), a superação da dormência tegumentar de *Pinus taeda* L. pode ser realizada pela imersão em água, após um período de permanência em baixas temperaturas. Dado isto, justifica-se a inserção do T1 na discussão a seguir.

A análise dos dados obtidos para a variável tempo médio de germinação (TMG) (Figura 6), faz com que seja possível concluir que os tratamentos com a aplicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apresentaram redução significativa do período de germinação, estatisticamente divergentes do tratamento controle com imersão das sementes em água por 48 horas (33,46 dias), atingindo 12,1 dias após tratamento com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 11,8 dias com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associado a *A. brasilense* 2083, 11,7 dias para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e *A. brasilense* 2084 e 11,4 dias para a imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação conjunta das estirpes. Para Çavusoglu e Kabar (2010), o pré-tratamento de sementes com oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, removeu enormemente os efeitos retardantes da germinação de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L. cv. Bülbül 89) e promoveu um ganho de cinco dias na germinação em relação ao tratamento controle.

A frequência relativa de germinação (Fr) (Figura 7) permitiu observar a distribuição da germinação ao longo do período avaliado. Os tratamentos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e *A. brasilense* 2083; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e *A. brasilense* 2084 e; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084 apresentaram uma distribuição platicúrtica, indicando que a germinação ocorreu de modo mais concentrado na primeira quinzena e se espalhou ao longo de todo o período avaliativo (45 dias). Contrariamente, o tratamento com água resultou em uma distribuição leptocúrtica, com maior concentração de sementes germinadas após o 25° dia e menor variação de germinação.

Por meio dos dados referentes ao índice de velocidade de germinação (IVG) (Figura 6), infere-se que os tratamentos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3,38) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2083 + 2084 (3,37) apresentaram maiores valores numéricos para velocidade de emergência de plântulas e de IVG, indicando ganhos em tempo no processo germinativo e um número maior de sementes emergidas por dia de avaliação. A imersão em H<sub>2</sub>O, por sua vez, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando IVG de 0,16. Tal valor, quando analisado juntamente com o percentual de sementes germinadas (13,0%) e TMG (33,46 dias), indica que o tratamento em questão foi ineficiente e vagaroso no processo germinativo de sementes de *Pinus taeda* L.

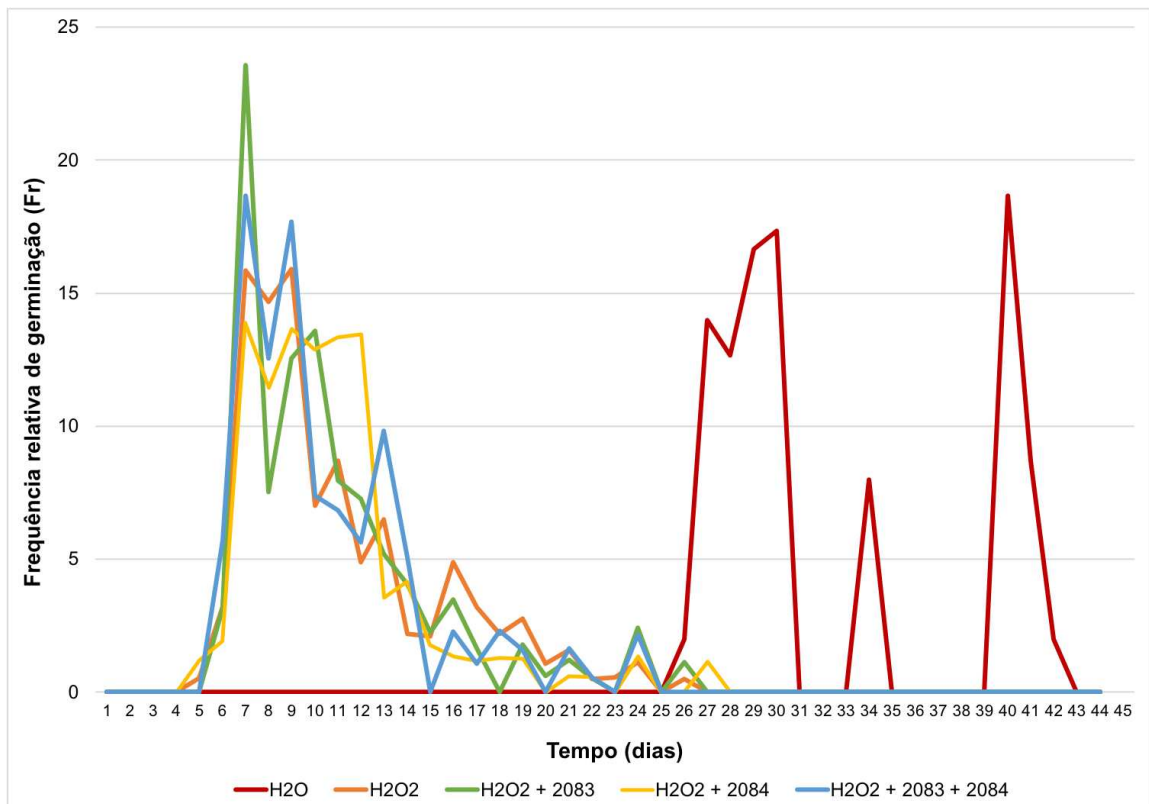
**FIGURA 6** – TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)



**FIGURA 7 –** CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

Conforme demonstrado na análise de variância (Anexo 2), as variáveis analisadas apresentaram variância de tratamentos homogêneas. Nesta análise, verificou-se que os tratamentos apresentaram diferença estatisticamente significativa, ou seja, diferenças entre as médias dos tratamentos aplicados para todas as variáveis analisadas.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias obtidas para cada variável nos tratamentos de sementes inoculadas com duas estirpes de *Azospirillum brasilense*, aplicadas de modo isolado ou combinado, e tratadas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O teste de comparação de médias revelou que todos os tratamentos aplicados, com exceção do controle com imersão em água, apresentaram médias elevadas de germinação, não diferindo estatisticamente entre si. O tratamento  $H_2O_2$  alcançou 92% de sementes germinadas, enquanto os tratamentos  $H_2O_2 + A. brasilense$  2083 e  $H_2O_2 + A. brasilense$  2083 + *A. brasilense* 2084 obtiveram taxa de germinabilidade de 88%, seguido de 80% para  $H_2O_2 + 2084$ . O tratamento controle, no qual as sementes permaneceram imersas sob agitação constante em água

destilada estéril por 48 horas, alcançou 13% de sementes germinadas, diferindo estatisticamente do restante dos tratamentos.

Em relação às sementes com germinação incompleta, o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2084 apresentou 10,5% de sementes anormais, não diferindo estatisticamente dos tratamentos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2083 + 2084 (5,0%) e água destilada (2,0%). Os tratamentos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2083 apresentaram os menores valores em percentual de sementes com germinação anormal (1,5%) (Tabela 3).

**TABELA 3 –** SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER), COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
H <sub>2</sub> O	13,0 b	85,0 a	2,0 ab	33,46 a	0,16 b
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	92,0 a	6,5 b	1,5 b	12,08 b	3,38 a
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2083	88,0 a	10,5 b	1,5 b	11,81 b	3,31 a
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2084	80,0 a	9,5 b	10,5 a	11,74 b	2,95 a
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2083 + 2084	88,0 a	7,0 b	5,0 ab	11,41 b	3,37 a

Fonte: Baldin (2021). Tratamentos: H<sub>2</sub>O (imersão em água); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (imersão em peróxido de hidrogênio); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *A. brasilense* 2083; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *A. brasilense* 2084; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inoculação de *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a aplicação de peróxido de hidrogênio agiu eficientemente na quebra da dormência tegumentar das sementes de *Pinus taeda* L. e contribuiu para um desenvolvimento germinativo superior. Tais resultados podem ser explicados pelo aumento do nível de O<sub>2</sub> gerado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que proporciona um aumento da taxa de respiração oxidativa e contribui para uma embebição mais efetiva das sementes. Com a entrada de água, iniciam-se processos fisiológicos complexos que promovem a germinação das sementes (Çavusoglu e Kabar, 2010). Em estudos de Ogawa e Iwabuchi (2001), a aplicação de peróxido de hidrogênio promoveu a germinação de 95,6% de sementes de *Zinnia elegans* L. tratadas com 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao tratamento controle, com 37,8% de sementes germinadas.

Os efeitos positivos da inoculação bacteriana de *Azospirillum brasilense*, no presente estudo, foram observados principalmente e visualmente no vigor pós-germinativo das plântulas de *Pinus taeda* L. (dados não apresentados) e, em associação com o peróxido de hidrogênio, no aumento das taxas de germinação

quando comparados ao tratamento testemunha com imersão em H<sub>2</sub>O. Tais incrementos podem ser atribuídos, principalmente, à capacidade de síntese de hormônios vegetais por algumas bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, que atuam em associação com as plantas e promovem efeitos positivos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (Didonet et al., 2012). De acordo com os resultados de síntese de compostos indólicos apresentados no Capítulo I, *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084 mostraram-se capazes de sintetizar o hormônio vegetal ácido indol-3-acético (IAA), alcançando valores entre 192,6 e 460,3 µg de IAA por mL de meio de crescimento.

Semelhantemente ao apresentado neste estudo, Cássan et al. (2009) relataram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* beneficiou a porcentagem de sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.), assim como ocasionou um crescimento mais pronunciado da raiz e do hipocótilo para as mudas inoculadas. Do mesmo modo, para Didonet et al. (2012), a inoculação de *Azospirillum brasilense* em sementes de arroz de sequeiro (*Oryza sativa*) contribuiu positivamente no incremento das taxas de germinação e melhorou as respostas quanto ao crescimento das raízes. No trabalho de Dartora et al. (2013), a inoculação com *A. brasilense* proporcionou aumentos na germinação de sementes de trigo, número de raízes e acúmulo de matéria seca de raízes.

Os resultados obtidos neste estudo apoiam que o emprego do peróxido de hidrogênio favoreceu a germinação de sementes de *Pinus taeda* L. e o crescimento inicial de plântulas, pois auxiliou na superação da quiescência e desenvolvimento das raízes.

#### **4.3.2 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com 38 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis***

Na presente experimentação foram empregados os dois tratamentos controles descritos na metodologia, sendo estes, respectivamente: T1 – imersão das sementes em água destilada estéril por 48 horas; e T2 – imersão das sementes em peróxido de hidrogênio por 60 minutos. Contudo, o tratamento T1 foi desconsiderado das análises estatísticas, pois não foi observada a germinação das sementes de *Pinus taeda* L. para este tratamento ao longo do período de avaliação (Figura 10).

Os tratamentos com aplicação de peróxido de hidrogênio agiram eficientemente na quebra da dormência tegumentar das sementes de *Pinus taeda* L. e ocasionaram uma conseqüente diminuição do tempo médio de germinação (TMG) e aumento do índice de velocidade de germinação (IVG) (Figura 8). A frequência relativa (Fr) (Figura 9) demonstrou uma distribuição platicúrtica de emergência, sendo observados os maiores picos das curvas ao longo dos primeiros 11 dias, permanecendo até o 29º dia em frequência reduzida. Isto indica uma grande variação e heterogeneidade de germinação, originada pelos diferentes períodos germinativos obtidos.

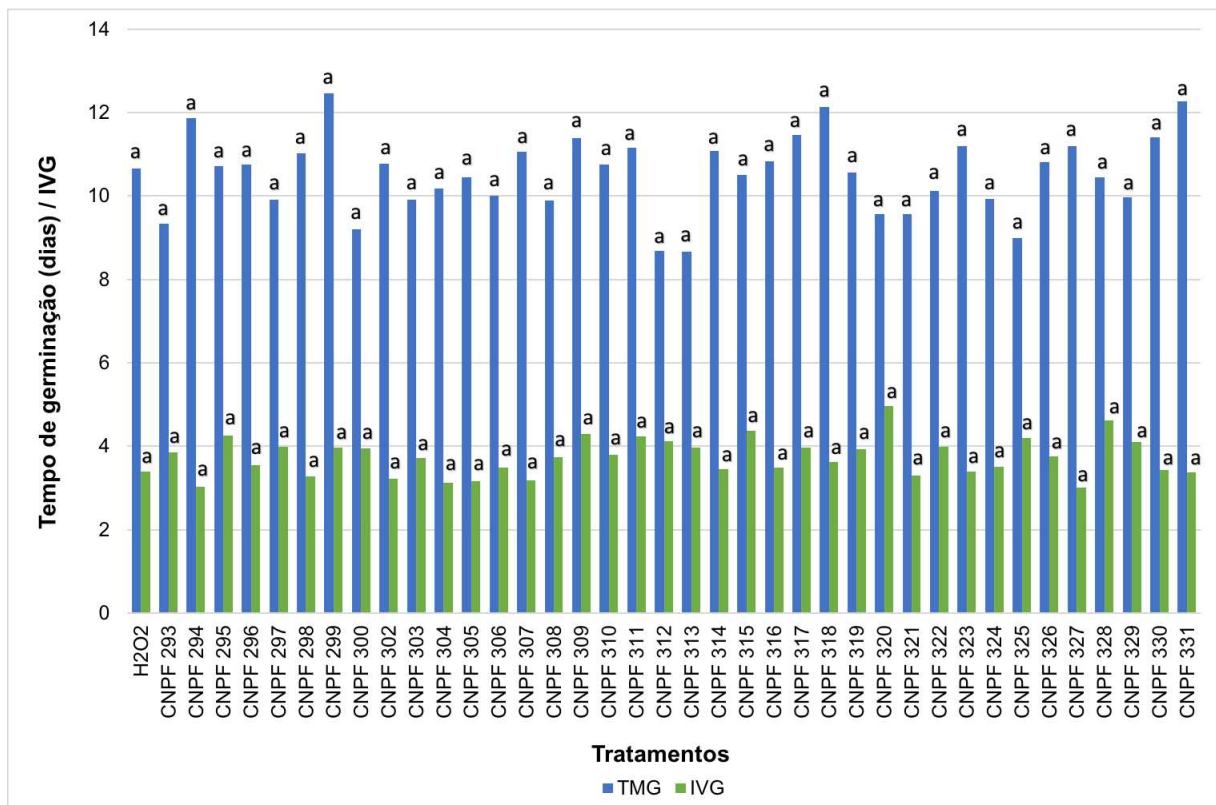
A aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou em um tempo médio de germinação de 10,7 dias, valor numericamente superior ao obtido por 52,6% dos tratamentos com inoculação de bactérias endofíticas. Em relação aos tratamentos com bactérias endofíticas, destacam-se as estirpes CNPF 312 (8,7 dias), CNPF 313 (8,67 dias) e CNPF 325 (9,0 dias), enquanto que a estirpe CNPF 299 apresentou o maior tempo médio de germinação, superior numericamente aos demais tratamentos, atingindo 12,5 dias para a emergência, seguido de CNPF 331 com 12,28 dias e CNPF 318 com 12,1 dias.

O IVG alcançou maior índice no tratamento com a bactéria CNPF 320 (4,96), seguido da CNPF 328 (4,62) e CNPF 315 (4,37). Os menores valores numéricos para as bactérias foram verificados para CNPF 327 (3,01), CNPF 294 (3,03) e CNPF 304 (3,13). Tais resultados, em comparação com TMG, mostram-se contrários e inversamente proporcionais. Valores elevados de IVG indicam um maior número de sementes germinadas por dia e, portanto, maior velocidade e menor tempo médio de germinação. A análise conjunta da germinabilidade e do IVG permitem inferir a qualidade fisiológica e o quão vigorosas são as sementes utilizadas (Ferreira e Borghetti, 2004).

É possível inferir, contudo, que os valores de tempo médio de germinação e índice de velocidade de germinação obtidos no presente estudo estão relacionados com a capacidade intrínseca de síntese de hormônios vegetais dos microrganismos inoculados às sementes de *Pinus taeda* L., uma vez que estes promovem uma série de efeitos promissores ou nocivos à germinação e crescimento das plântulas emergidas, dependendo da concentração e do momento do ciclo da planta em que são sintetizados. Marques et al. (2014) constataram que a inoculação com *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp. proporcionou uma diminuição significativa no tempo

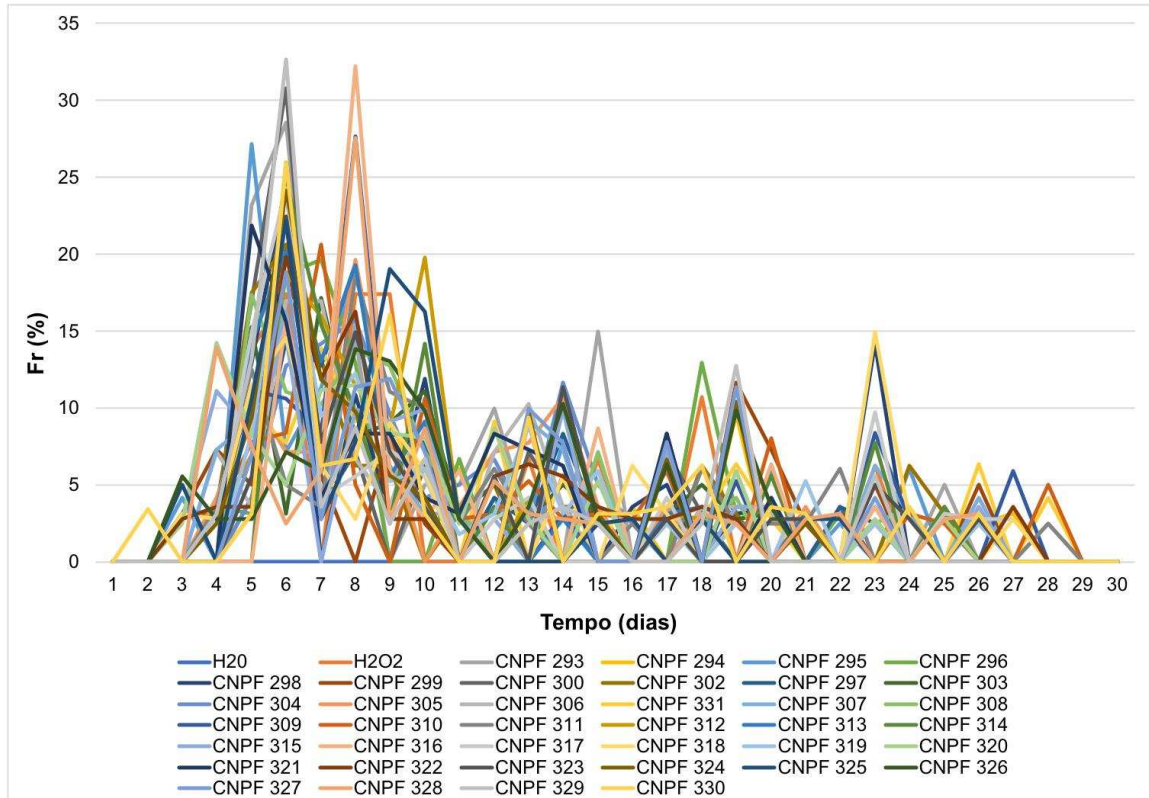
médio de germinação e aumentou a velocidade de germinação das sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtendo sementes germinadas com 8,6 dias com *Bacillus* sp. em relação a testemunha, que germinou aos 12,5 dias. A aplicação de inóculo composto por *Gluconacetobacter diazotrophicus* em sementes de arroz vermelho promoveu um aumento considerável no índice de velocidade de germinação (IVG), com incremento de 41,7% em relação a testemunha, devido à liberação de ácido giberélico e IAA pela bactéria em questão (Silva Filho, 2016).

**FIGURA 8 –** TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

**FIGURA 9** – CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

A análise de variância (ANOVA) (Anexo 3) demonstrou que as variáveis de germinação analisadas (%GER, %NGER e %GERINC) não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Conforme análises realizadas, a embebição das sementes de *Pinus taeda* L. em solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) proporcionou uma relevante melhoria na germinação, uma vez que a taxa de germinabilidade foi nula para a imersão em água destilada estéril (dados não apresentados). O tratamento controle com peróxido de hidrogênio (T2) apresentou 72,5% de sementes germinadas. Essa melhoria no processo germinativo perante à aplicação de  $H_2O_2$  pode ser atribuída à atividade antioxidante deste composto químico, que suprime a atividade de inibidores da germinação no tegumento das sementes, favorece as trocas gasosas e a absorção de água (Çavusoglu e Kabar, 2010).

Em relação aos tratamentos com inóculos bacterianos endofíticos isolados de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, 30 dentre os 38 isolados testados, correspondendo

a aproximadamente 79%, apresentaram igualdade ou superioridade numérica ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora não tenham diferido estatisticamente entre si (Tabela 4). A inoculação com a bactéria CNPF 311 alcançou o maior valor numérico observado, com 92,5% de germinabilidade ao final do prazo de avaliação. Com 90% de sementes germinadas, observaram-se as bactérias CNPF 309, CNPF 320 e CNPF 328. Destacam-se também as estirpes bacterianas CNPF 299 e CNPF 319 com 85%; CNPF 295 com 82,5%; CNPF 310, CNPF 312, CNPF 315, CNPF 316, CNPF 317, CNPF 322, CNPF 325 e CNPF 329 com 80%.

As bactérias endofíticas avaliadas no presente estudo apresentaram-se positivas quanto à síntese de ácido indol-3-acético (IAA) (Capítulo I), corroborando com os percentuais obtidos no processo germinativo de *Pinus taeda* L. Em associação com as auxinas, as giberelinas encontram-se intimamente relacionadas a processos fisiológicos do metabolismo vegetal, como a germinação e o desenvolvimento do sistema radicular. Para Marques et al. (2014), as bactérias colonizadoras de plantas podem apresentar efeito benéfico, neutro ou até mesmo deletério às suas hospedeiras, sendo necessária uma avaliação específica sobre a aplicação das mesmas.

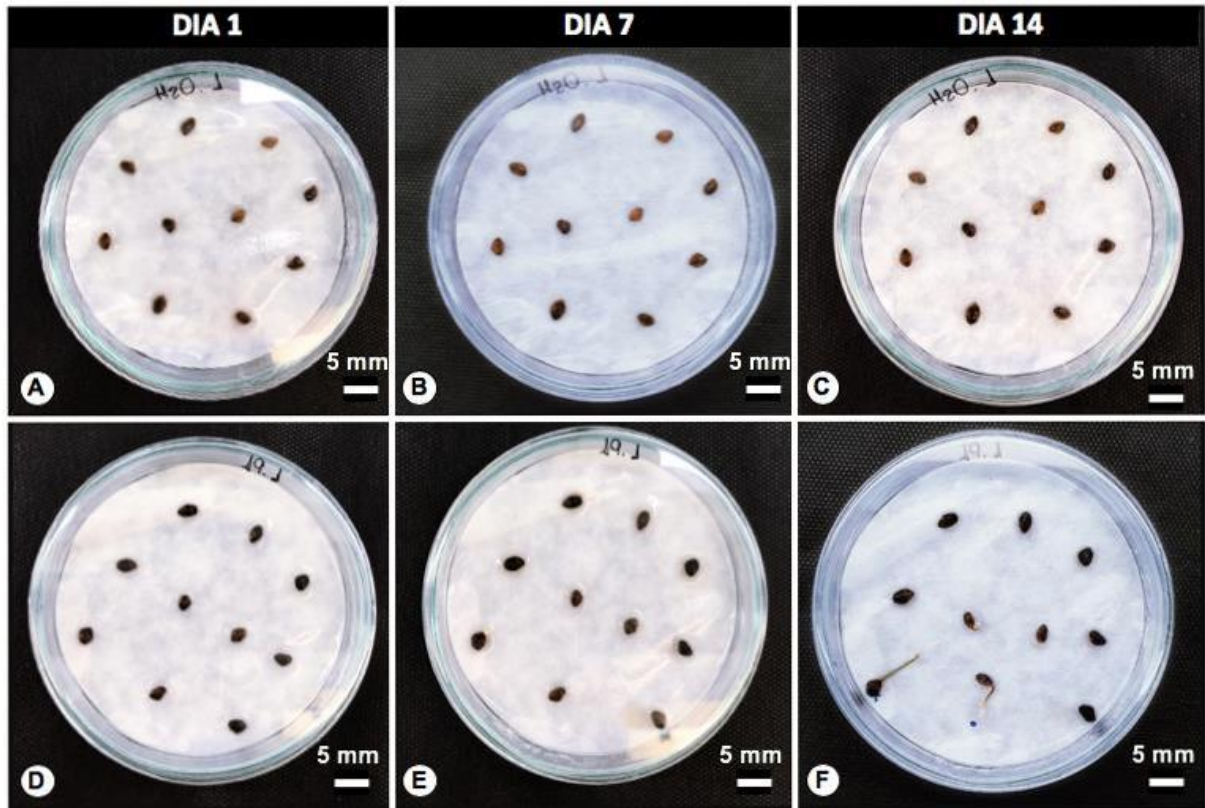
**TABELA 4 –** SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER), COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Pinus taeda* L INOCULADAS COM 38 ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENDÓFITICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	72,50 a	20,00 a	7,50 a	10,65 a	3,40 a
CNPF 293	72,50 a	20,00 a	7,50 a	9,33 a	3,86 a
CNPF 294	67,50 a	30,00 a	2,50 a	11,86 a	3,03 a
CNPF 295	82,50 a	17,50 a	0,00 a	10,72 a	4,26 a
CNPF 296	75,00 a	25,00 a	0,00 a	10,75 a	3,54 a
CNPF 297	72,50 a	25,00 a	2,50 a	9,91 a	3,99 a
CNPF 298	65,00 a	32,50 a	2,50 a	11,02 a	3,27 a
CNPF 299	85,00 a	15,00 a	0,00 a	12,47 a	3,97 a
CNPF 300	72,50 a	27,50 a	0,00 a	9,21 a	3,94 a
CNPF 302	72,50 a	27,50 a	0,00 a	10,78 a	3,22 a
CNPF 303	75,00 a	22,50 a	2,50 a	9,91 a	3,72 a
CNPF 304	70,00 a	30,00 a	0,00 a	10,18 a	3,13 a
CNPF 305	67,50 a	32,50 a	0,00 a	10,44 a	3,16 a
CNPF 306	72,50 a	27,50 a	0,00 a	10,01 a	3,48 a
CNPF 307	67,50 a	27,50 a	5,00 a	11,07 a	3,19 a
CNPF 308	75,00 a	25,00 a	0,00 a	9,90 a	3,73 a
CNPF 309	90,00 a	10,00 a	0,0 a	11,38 a	4,29 a
CNPF 310	80,00 a	20,00 a	0,00 a	10,75 a	3,79 a
CNPF 311	92,50 a	7,50 a	0,00 a	11,16 a	4,23 a
CNPF 312	80,00 a	20,00 a	0,00 a	8,67 a	4,12 a
CNPF 313	77,50 a	22,50 a	0,00 a	8,67 a	3,97 a
CNPF 314	77,50 a	20,00 a	2,50 a	11,08 a	3,45 a
CNPF 315	80,00 a	20,00 a	0,00 a	10,51 a	4,37 a
CNPF 316	80,00 a	20,00 a	0,00 a	10,83 a	3,49 a
CNPF 317	80,00 a	20,00 a	0,00 a	11,46 a	3,97 a
CNPF 318	75,00 a	20,00 a	5,00 a	12,14 a	3,62 a
CNPF 319	85,00 a	15,00 a	0,00 a	10,56 a	3,92 a
CNPF 320	90,00 a	10,00 a	0,00 a	9,56 a	4,96 a
CNPF 321	65,00 a	30,00 a	5,00 a	9,57 a	3,30 a
CNPF 322	80,00 a	20,00 a	0,00 a	10,12 a	3,99 a
CNPF 323	75,00 a	25,00 a	0,00 a	11,19 a	3,40 a
CNPF 324	70,00 a	30,00 a	0,00 a	9,94 a	3,51 a
CNPF 325	80,00 a	20,00 a	0,00 a	8,98 a	4,19 a
CNPF 326	77,50 a	22,50 a	0,00 a	10,81 a	3,75 a
CNPF 327	67,50 a	32,50 a	0,00 a	11,19 a	3,01 a
CNPF 328	90,00 a	10,00 a	0,00 a	10,44 a	4,62 a
CNPF 329	80,00 a	20,00 a	0,00 a	9,96 a	4,11 a
CNPF 330	77,50 a	22,50 a	0,00 a	11,40 a	3,43 a
CNPF 331	77,50 a	22,50 a	0,00 a	12,28 a	3,38 a

Fonte: Baldin (2021). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**FIGURA 10** – SEMENTES GERMINADAS DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021). Legenda: A, B e C – sementes de *Pinus taeda* L. submetidas a imersão em água estéril por 48 horas no 1°, 7° e 14° dia após instalação da germinação *in vitro*; D, E e F – sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com a estirpe CNPF 303 no 1°, 7° e 14° dia após instalação da germinação *in vitro*.

Tendo em vista a superioridade numérica de grande parte dos tratamentos com inóculos bacterianos em relação ao peróxido de hidrogênio, estudos semelhantes comprovam a eficácia de bactérias promotoras de crescimento em plantas na germinação de sementes de várias espécies vegetais. De acordo com Araújo et al. (2010), a inoculação das bactérias *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia brasilensis*, *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum amazonense* contribuiu para o aumento da taxa e velocidade de germinação das sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e maior desenvolvimento e comprimento dos coleótilos e raízes. *Bacillus subtilis* conferiu ganhos significativos na emergência e crescimento de plântulas de milho, soja e algodão, uma vez que sintetiza ácido indol-3-acético (IAA) (Araújo, 2008). No âmbito florestal, *Bacillus subtilis* promoveu efeitos positivos no desenvolvimento radicular e aéreo de mudas de *Pinus taeda* L., aumentando o peso seco de raiz em 67,1% e de parte aérea em 33,1% (Santos et al., 2018).

Índices de germinabilidade inferiores ao tratamento controle (T2) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (72,5%) são observados para as estirpes bacterianas CNPF 294, CNPF 298, CNPF 304, CNPF 305, CNPF 307, CNPF 321, CNPF 324 e CNPF 327. Tais resultados podem ser justificados por uma possível desregulação hormonal entre auxinas e ácido giberélico. É sabido que, quando sintetizados em concentrações maiores do que o ideal, os hormônios vegetais apresentam certo nível de toxicidade e acabam prejudicando a ocorrência de processos fisiológicos fundamentais no metabolismo vegetal, causando efeitos deletérios, como a diminuição do percentual de sementes germinadas.

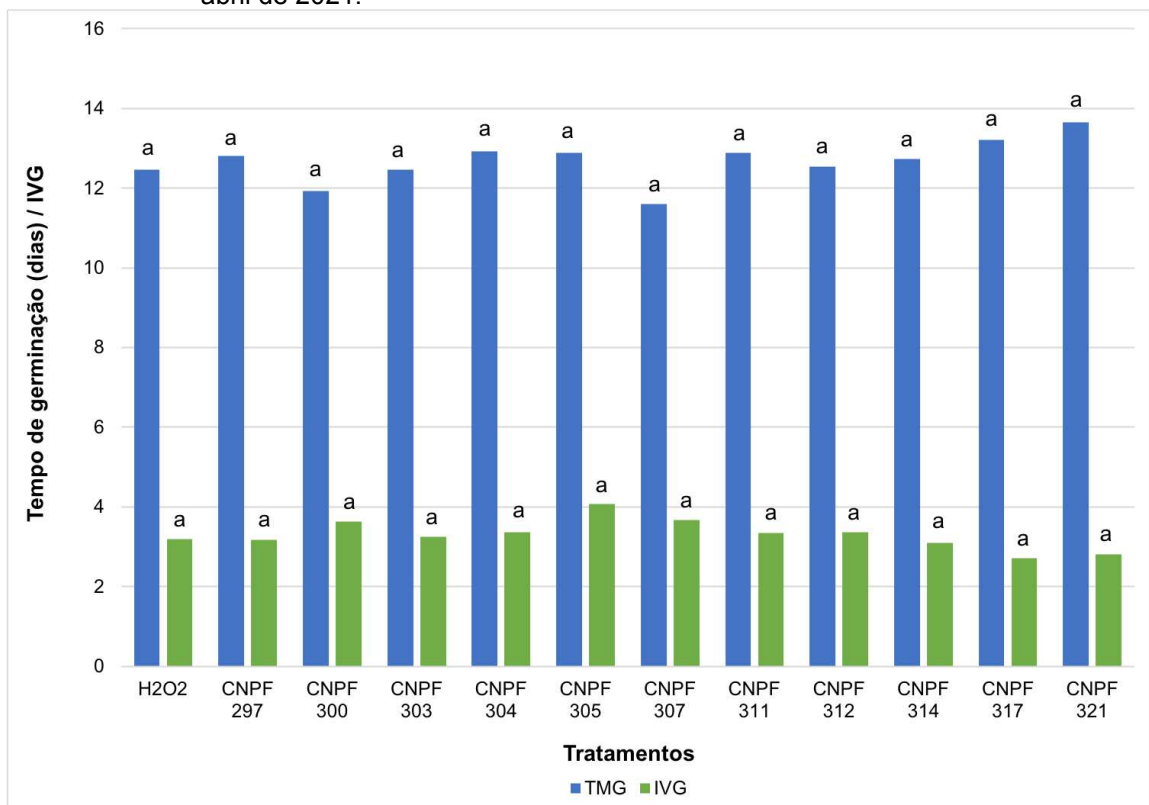
#### **4.3.3 Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. inoculadas com 11 bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis***

Assim como nos experimentos anteriormente descritos, foram utilizados, neste estudo, dois tratamentos controles: imersão das sementes em H<sub>2</sub>O por 48 horas (T1) e imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos (T2). A imersão em água resultou na ausência completa de sementes germinadas (%GER) ao longo dos 45 dias em que decorreu o experimento, sendo este tratamento desconsiderado das análises estatísticas. A nulidade de germinação indica que a imersão em água por 48 horas e armazenamento em baixas temperaturas não é eficaz na quebra da dormência das sementes de *Pinus taeda* L., como fora indicado por Floriano (2004).

Para tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG) (Figura 11), não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com aplicação de peróxido de hidrogênio. As estirpes bacterianas CNPF 307 e CNPF 300 proporcionaram, numericamente, os menores tempos para emergência (11,60 e 11,93 dias) e elevados valores numéricos de IVG (3,67 e 3,64, respectivamente). O maior valor numérico de IVG foi observado para CNPF 305 (4,07), representando uma germinação mais rápida desse tratamento em relação aos demais, embora não tenha diferido estatisticamente entre as bactérias. Contrariamente, o uso das bactérias CNPF 317 e CNPF 321 conduziu a um tempo maior de germinação (13,21 e 13,65 dias, respectivamente) em comparação ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12,47 dias). Os mesmos tratamentos apresentaram os menores valores numéricos para IVG (2,72 e 2,80, nesta ordem), indicando uma menor

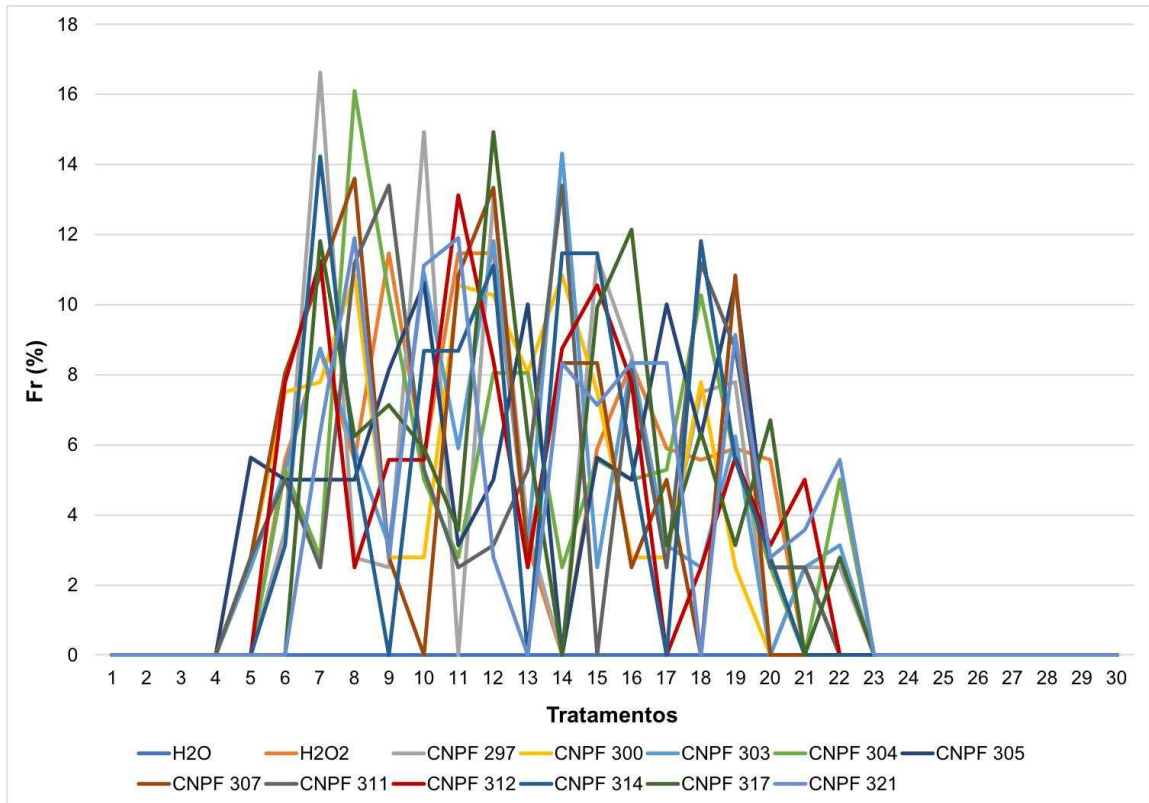
velocidade de germinação. Por meio da frequência relativa de germinação (Fr), observou-se que os tratamentos com bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* apresentaram uma distribuição leptocúrtica, visto que as sementes germinaram de modo concentrado entre o 4° e 23° dia (Figura 12).

**FIGURA 11** – TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 11 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. DUAS COLUNAS COM PELO MENOS UMA LETRA EM COMUM CORRESPONDEM A TRATAMENTOS COM MÉDIAS QUE NÃO DIFEREM ENTRE SI COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021)

**FIGURA 12** – CURVAS DE FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE GERMINAÇÃO (Fr) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM 38 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E IMERSÃO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.



O Anexo 4 apresenta o resumo do quadro da análise de variância (ANOVA) para as variáveis avaliadas. Verificou-se que as variáveis porcentagem de sementes germinadas (%GER), sementes não germinadas (%NGER) e sementes com germinação incompleta (%GERINC) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5).

Apesar da igualdade estatística, os tratamentos nos quais as bactérias endofíticas foram inoculadas contaram com ganhos visuais em crescimento e vigor das plântulas em relação ao tratamento com imersão em peróxido de hidrogênio.

**TABELA 5 –** SEMENTES GERMINADAS (%GER), NÃO GERMINADAS (%NGER) E COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM 11 ESTIRPES SELECIONADAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	87,50 a	10,00 a	2,50 a	12,47 a	3,19 a
CNPF 297	90,00 a	7,50 a	2,50 a	12,80 a	3,18 a
CNPF 300	95,00 a	5,00 a	0,00 a	11,93 a	3,64 a
CNPF 303	87,50 a	10,00 a	2,50 a	12,47 a	3,24 a
CNPF 304	95,00 a	5,00 a	0,00 a	12,93 a	3,36 a
CNPF 305	95,00 a	5,00 a	0,00 a	12,88 a	4,07 a
CNPF 307	92,50 a	7,50 a	0,00 a	11,60 a	3,67 a
CNPF 311	92,50 a	5,00 a	2,50 a	12,88 a	3,34 a
CNPF 312	92,50 a	7,50 a	0,00 a	12,53 a	3,37 a
CNPF 314	87,50 a	10,00 a	2,50 a	12,73 a	3,09 a
CNPF 317	80,00 a	17,50 a	2,50 a	13,21 a	2,72 a
CNPF 321	82,50 a	12,50 a	5,00 a	13,65 a	2,80 a

Fonte: Baldin (2021). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O emprego de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementou consideravelmente a germinabilidade das sementes de *Pinus taeda* L., pois agiu na superação da dormência tegumentar através da supressão de quaisquer inibidores, amolecimento do tegumento duro, fluxo de água para o interior das sementes e aumento das trocas gasosas. Para o tratamento controle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observada 87,5% de germinabilidade, valor numericamente superado por 8 das 11 estirpes bacterianas analisadas. Os maiores percentuais de germinação foram observados para CNPF 300, CNPF 304 e CNPF 305 (95%). Em seguida, com 92,5% de sementes germinadas estão as estirpes CNPF 307, CNPF 311 e CNPF 312 e; com 90%, CNPF 297. Os menores valores para %GER foram relatados para CNPF 317 (80%) e CNPF 321 (82,5%) (Tabela 5).

Efeitos benéficos semelhantes a este estudo, no qual foram obtidas taxas de germinação entre 80% e 95% para as bactérias endofíticas, foram relatados por Florentino et al. (2017), onde a inoculação com seis bactérias endofíticas e *Azospirillum brasilense* AbV5 proporcionaram um aumento nas porcentagens de germinação, as quais permaneceram entre 82,5% e 96,6%. Ademais, a inoculação com a maioria das estirpes ocasionou aumentos no crescimento radicular e massa

seca de parte aérea quando comparado ao tratamento controle, ressaltando à capacidade de síntese de IAA pelas bactérias utilizadas. Brandão e Brandão (2016) constataram que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *Bacillus subtilis*, *Frauteria aurantia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. e bactéria VC2 (não identificada) aumentaram a germinação de sementes de eucalipto, matéria seca de raízes e parte aérea das mesmas. Já Stroschein et al. (2011) verificaram que rizobactérias isoladas de alfafa em sementes de arroz promoveram um aumento na porcentagem de germinação, aumento da velocidade de germinação, redução do índice de velocidade de germinação e aumento do comprimento das raízes e parte aérea.

A proeminência dos tratamentos com bactérias endofíticas deve-se à competência de síntese microbiana de hormônios vegetais, como ácido indol-3-acético (IAA). A aplicação desses microrganismos acarreta na promoção de uma série de efeitos promissores às plantas, como controle de fitopatógenos, promoção do crescimento de raízes, indução de germinação e indução do desenvolvimento de parte aérea. Tais benefícios devem-se à função do IAA em estimular a atividade da bomba  $H^+ATPase$  da membrana plasmática celular, a qual promove a secreção de íons hidrogênio para a parede celular vegetal, acidificando-a e afrouxando-a. Esse afrouxamento da parede celular faz com que moléculas de  $H_2O$  penetrem mais facilmente nas células vegetais e as expandam, desencadeando a elongação celular (Castro, 1979).

Quando a síntese desses hormônios vegetais ocorre de modo desregulado, seja em concentrações inferiores ou superiores ao necessário à planta, são observados fenômenos fisiológicos indesejados, como a diminuição do crescimento e desenvolvimento vegetal. Corroborando com os resultados da produção microbiana de IAA (Capítulo I), a inoculação com os isolados CNPF 317 e CNPF 321 apresentaram as menores taxas de germinação e duas das maiores concentrações de IAA microbiano sintetizado (503,7 e 342,6  $\mu g mL^{-1}$ ). Entretanto, CNPF 304 e CNPF 307 apresentaram as maiores concentrações de IAA, assim como os maiores percentuais de sementes de *Pinus taeda* L. germinadas. A partir disso é possível inferir que o sucesso do processo germinativo é devido não somente à síntese de auxinas, mas majoritariamente pela presença de ácido giberélico nos tecidos vegetais, uma vez que ambos os hormônios controlam esse processo fisiológico. Estudos de síntese microbiana de giberelinas não foram realizados no presente estudo.

## CONCLUSÕES

Nas condições que o presente estudo foi realizado, foi possível obter as seguintes conclusões:

- A inoculação com peróxido de hidrogênio beneficiou a germinação de *Pinus taeda* L. em relação ao tratamento com água estéril.
- *A. brasilense* e inóculos de bactérias endofíticas contribuíram para a redução do tempo médio de germinação, incremento do índice de velocidade de germinação e ganhos em vigor e crescimento das plântulas.
- As bactérias CNPF 300, 304, 305, 309, 320 e 328 constituíram inóculos eficientes no incremento da germinabilidade, aumento da velocidade de germinação e diminuição do tempo médio de germinação em sementes de *Pinus taeda* L.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. L. M. **Fisiologia, bioquímica e morfologia da germinação de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Ceará, 2009, 111 p.
- ARAÚJO, F. F. de. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.
- ARAÚJO, A. E. da S.; ROSSETTO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.
- BRANDÃO, J. de F. C.; BRANDÃO, I. J. **Efeitos da rizobacterização na germinação de sementes e no crescimento de mudas de espécie nativa**. II Seminário Científico da FACIG, I Jornada de Iniciação Científica da FACIG, 2016.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Secretaria de Defesa Agropecuária. MAPA/ACS, 2009, 399 p.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* az39 and *Bradyrhizobium japonicum* e109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) And soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 28-35, 2009.
- CASTRO, P. R. C. Mecanismo de Ação Auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 36, p. 621-634, 1979.
- ÇAVUSOGLU, K; KABAR, K. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. **EurAsian Journal of Biosciences**, v. 4, p. 70-79, 2010.
- CORDEIRO, J. E. B. **Desempenho agrônômico do milho em resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas**. Dissertação (Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários), Universidade Federal de Viçosa, 2017, 95 p.
- COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. da S. F.; NAVES, D. C. de F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. de S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304-311, 2015.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; PINTO JÚNIOR, A. S.; CRUZ, L. M.; MENSCH, R. Influência do tratamento de sementes no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 175-181, 2013.



DIDONET, C. C. G. M.; FERREIRA, E. P. de B.; STEFFENS, M. B. R. Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em arroz de aqueiro (*Oryza sativa*): respostas fisiológicas em estudos *in vitro*. **FERTBIO**, Maceió, Alagoas, 2012.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Editora Artmed, 2004, 323 p.

FLORENTINO, L. A.; SILVA, A. B.; LANDGRAF, P. R. C.; SOUZA, F. R. C. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indolacético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 89-96, 2017.

FLORIANO, E. P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. Associação de Pesquisa, Educação e Proteção Ambiental do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (ANORGS), Caderno Didático, n. 2, 1. Ed. Santa Rosa, Rio Grande do Sul, 2004.

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 97 p.

LABOURIAU, L. G. A germinação das sementes. **Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos**, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 24ª Ed. Série de Biologia, 1983, 174 p.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 263-284, 1976.

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

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARQUES, E.; AQUILES, K. R.; BLUM, L. E. B.; UESUGI, C. H. Bactérias extremófilas facultativas melhorando a germinabilidade de sementes de *Eucalyptus urophylla* s.t. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 38, n. 3, p. 489-494, 2014.

MATOSO, E. S. **Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, 2017, 116 p.

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S.; SANTOS, O. J. P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.

MUMBACH, G. L.; KOTOWSKI, I. E.; SCHNEIDER, F. J. A.; MALLMANN, M. S.; BONFADA, É. B.; PORTELA, V. O.; BONFADA, É. B.; KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2017.

OGAWA, K.; IWABUCHI, M. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiology**, v. 42, n. 3, p. 286-291, 2001.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

QUISEN, R. C.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Metodologia de descontaminação e germinação de sementes de *Pinus taeda* L. **Comunicado Técnico**, n. 449, p. 1-6, Embrapa Florestas, 2020.

REGO, S. S.; COSMO, N. L.; GOGOSZ, A. M.; KUNIYOSHI, Y. S.; NOGUEIRA, A. C. Caracterização morfológica e germinação de sementes de *Curitiba prismatica* (D. Legrand) Salywon & Landrum. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, 2011.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SANTOS, R. F. dos; CRUZ, S. P. da; BOTELHO, G. R.; FLORES, A. V. Inoculation of *Pinus taeda* seedlings with plant growth-promoting rhizobacteria. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 1, 2018.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA FILHO, A. M. **Potencialização da germinação e crescimento inicial de arroz vermelho inoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, 2016, 71 p.

STROSCHEIN, M. R. D.; SÁ, E. L. S. de; MACHADO, R. G.; CABRAL, L. de L.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; FONTOURA, R. C. da. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.

TITON, M.; XAVIER, A.; REIS, G. G.; OTONI, W. C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 619-625, 2003.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. **Documentos 130**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Colombo, Paraná, 2006.

## 5 CAPÍTULO III: ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Pinus taeda* L. E DE MICROESTACAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* *in vitro* POR MEIO DE INOCULANTES MICROBIANOS

### RESUMO

O uso de bactérias associativas e promotoras de crescimento tem gerado resultados promissores no desenvolvimento vegetal de inúmeras espécies. Na silvicultura clonal, a inoculação desses microrganismos favorece o processo rizogênico e o desenvolvimento da parte aérea, constituindo raízes com maior qualidade e vigor, bem como maior número de brotações. Mudanças produzidas a partir da inoculação de bioinoculantes tendem a apresentar uma maior taxa de sobrevivência e desempenho em campo, uma vez que o sistema radicial apresenta-se mais desenvolvido. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das bactérias endofíticas, *Azospirillum brasilense* e ácido indol-3-butírico (IBA) no enraizamento adventício de miniestacas de *Pinus taeda* L. e microestacas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Foram realizados três experimentos neste estudo. No primeiro experimento, as miniestacas de *P. taeda* L. foram inoculadas com *A. brasilense* estirpe 2083, *A. brasilense* estirpe 2084 e três concentrações de IBA (2000, 4000 e 6000 mg L<sup>-1</sup>). No segundo, 27 isolados de bactérias endofíticas (pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas e denominados como CNPF) foram aplicados nas miniestacas de *P. taeda* L. No último experimento, realizado em condições *in vitro*, onze bactérias endofíticas isoladas de *P. caribaea* var. *hondurensis* foram testadas no enraizamento de microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis*. As variáveis analisadas nos experimentos de macropropagação foram percentual de miniestacas enraizadas, número de raízes/miniestaca, comprimento médio de raízes/miniestaca, porcentagem de miniestacas com calos, vivas, mortas, com manutenção das folhas iniciais e com brotações. Em condições *in vitro* avaliou-se o percentual de microestacas enraizadas, vivas, mortas, com brotações, número de brotações/microestaca e comprimento médio das microestacas. Com relação ao enraizamento de miniestacas de *P. taeda* L., a inoculação com as estirpes de *A. brasilense* gerou incrementos no enraizamento (2083 e 2084 – 13,75%; 2083+2084 – 15%), quando comparada ao uso de IBA (2000 e 6000 mg L<sup>-1</sup> – 8,75%; 4000 mg L<sup>-1</sup> – 11,25%), assim como aumentos no número de raízes/miniestaca (2083 – 3,5; 2084 – 3,0; 2083+2084 – 3,25) e comprimento médio de raízes (2083 – 11,15 cm; 2084 – 10,93 cm; 2083+2084 – 6,89 cm). O isolado CNPF 316 promoveu o maior índice de enraizamento (12,50%), número de raízes/miniestaca (2,75) e comprimento médio de raízes (11,02 cm). Em condições *in vitro*, para *P. caribaea* var. *hondurensis*, não houve enraizamento das microestacas. Os isolados CNPF 300 e CNPF 303 geraram maior crescimento e desenvolvimento aéreo das microestacas, por meio de incrementos em altura (6,66 cm) e formação de novas brotações adventícias (3,10).

Palavras-chave: propagação vegetativa, rizogênese, bactérias promotoras de crescimento vegetal.

## ABSTRACT

The use of associative and growth-promoting bacteria has generated promising results in plant development of great number of species. In clonal silviculture, the inoculation of these microorganisms favors the rhizogenic process and the development of aerial part, constituting roots with greater quality and vigor, as well as a greater number of buds. Seedlings produced from the inoculation of bioinoculants tend to have a higher rate of survival and performance in the field, since the root system is more developed. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of endophytic bacteria, *Azospirillum brasilense* and indole-3-butyric acid (IBA) on the adventitious rooting of *Pinus taeda* L. minicuttings and *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* microcuttings. Three experiments were performed in this study. In the first experiment, *P. taeda* L. minicuttings were inoculated with *A. brasilense* strain 2083, *A. brasilense* strain 2084 and three concentrations of IBA (2000, 4000 and 6000 mg L<sup>-1</sup>). In the second, 27 isolates of endophytic bacteria (belong to the Embrapa Forestry Collection of Microorganisms and named as CNPF) were applied to the minicuttings. In the last one, realized *in vitro* conditions, eleven endophytic bacteria isolated from *P. caribaea* var. *hondurensis* were tested in rooting of *P. caribaea* var. *hondurensis* microcuttings. The analyzed variables in macropropagation experiments were rooting percentage, average number of roots/minicutting, medium length roots/minicutting, percentage of minicuttings with callus, alive, dead, maintenance of initial leaves and minicuttings budded. Under *in vitro* conditions were analyzed the percentage of rooted microcuttings, alive and dead, microcuttings budded, average number of buds/minicutting and medium length of microcuttings. In relation to the rooting of *P. taeda* L. minicuttings, the inoculation with both strains of *A. brasilense* increased rooting (2083 and 2084 – 13,75%; 2083+2084 – 15%) when compared to IBA (2000 and 6000 mg L<sup>-1</sup> – 8,75%; 4000 mg L<sup>-1</sup> – 11,25%), number of roots/minicutting (2083 – 3,5; 2084 – 3,0; 2083+2084 – 3,25) and medium length of roots (2083 – 11,15 cm; 2084 – 10,93 cm; 2083+2084 – 6,89 cm). The isolate CNPF 316 promoted the highest rate of rooting (12,50%), number of roots/minicuttings (2,75) and medium length of roots (11,02 cm). Under *in vitro* conditions, for *P. caribaea* var. *hondurensis*, there were no microcuttings rooted. The isolates CNPF 300 and CNPF 303 reached greater aerial plant growth and development of microcuttings by increments in height (6,66 cm) and formation of new buds (3,10).

Keywords: vegetative propagation, rhizogenesis, plant growth-promoting bacteria.

## 5.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de miniestaquia e micropropagação vegetativa, empregadas à propagação de espécies florestais, constituem alternativas bastante eficientes de superação das dificuldades encontradas na propagação seminal. O uso da propagação sexuada tem limitado a produção comercial de mudas, uma vez que gera plantios desuniformes, mudas com baixa qualidade e grande variação genotípica. As técnicas de propagação vegetativa, embora sejam inicialmente mais caras devido ao investimento em infraestrutura, tornam-se mais rentáveis com o passar do tempo e aumentam consideravelmente a produtividade dos plantios (Andrejow e Higa, 2009; Dias et al., 2012).

Posto isso, a miniestaquia e a propagação *in vitro* proporcionam a fixação e conservação de genótipos selecionados, evitando a variabilidade genética, e contribuem para a formação de plantios clonais mais produtivos e com qualidade superior das mudas. Ademais, esses métodos permitem a obtenção de grande número de plantas sadias, com elevada qualidade fisiológica e geneticamente uniformes, em um curto intervalo de tempo (Wendling et al., 2006; Dias et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Atualmente, tanto a miniestaquia como a microestaquia são altamente empregadas na silvicultura clonal intensiva, principalmente em espécies com alto valor comercial agregado e dificuldade no processo rizogênico, como *Pinus* spp. (Andrejow, 2006; Dias et al., 2012; Oliveira et al., 2013).

Na miniestaquia, os propágulos vegetativos, ditos miniestacas, são obtidos a partir da coleta de ápices caulinares brotados de mudas oriundas de estacas já enraizadas pelo método tradicional de estaquia ou de mudas seminais. Essa técnica consiste no aumento da juvenilidade do material vegetal e consequente incremento do grau de iniciação e crescimento radicial (Andrejow, 2006; Andrejow et al., 2009; Miranda, 2015). Já a organogênese, uma das rotas de desenvolvimento da propagação vegetativa *in vitro*, consiste na produção de eixos caulinares (brotações adventícias que originam as microestacas) a partir de gemas pré-existentes e indução das mesmas ao enraizamento *in vitro*, buscando a obtenção de plântulas com um sistema radicial e parte aérea bem desenvolvidos (Titon et al., 2003; Wendling et al., 2006; Miranda, 2015).

O processo de formação de raízes adventícias é um processo anatômico e fisiológico complexo, no qual ocorre a desdiferenciação e posterior rediferenciação

das células vegetais totipotentes para a formação de regiões meristemáticas que originarão raízes adventícias (Andrejow, 2006; Antonelli, 2013; Miranda, 2015). A formação de um novo sistema radicial ocorre, principalmente, devido à ação de hormônios vegetais, os quais controlam o desenvolvimento vegetal em todas as fases da vida da planta (Miranda, 2015). As auxinas são os principais responsáveis pelo enraizamento adventício e são a classe hormonal mais estudada, uma vez que sua síntese ocorre não somente em plantas, mas também em microrganismos associativos encontrados na região da rizosfera, na superfície das plantas ou internamente aos tecidos vegetais, sendo neste caso denominados endofíticos (Brunetta, 2006; Panigrahi et al., 2019). O ácido indol-3-butírico (IBA) destaca-se como a auxina sintética mais empregada na potencialização da rizogênese adventícia, pois apresenta baixos índices de toxicidade em uma maior amplitude de concentrações e resultados satisfatórios, em sua grande maioria (Hartmann et al., 2002; Antonelli, 2013).

Essa comunidade microbiana associada às plantas é composta principalmente por bactérias endofíticas, as quais habitam o interior dos tecidos vegetais e estabelecem relações mutualísticas com suas plantas hospedeiras, beneficiando o desenvolvimento das mesmas como um todo através de vários mecanismos, como a síntese de hormônios vegetais, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, entre outros (Brunetta, 2006; Panigrahi et al., 2019).

O emprego de bactérias associativas, endofíticas ou epifíticas, em processos de clonagem vegetal, assim como de auxinas sintéticas, pode fornecer uma série de benefícios às plantas, como aumento do número e comprimento de raízes adventícias e secundárias, aumento da área foliar das mudas, maior resistência das plantas a estresses e consequente diminuição do percentual de necrose vegetal (Miranda, 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de *Azospirillum brasilense*, isolados de bactérias endofíticas e ácido indol-3-butírico no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. e microestacas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos a seguir foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas, Colombo (PR), e em casa de vegetação do Laboratório de Macropropagação do Departamento de Botânica, no Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR).

### 5.2.1 Miniestaquia de *Pinus taeda* L. com inoculação de *Azospirillum brasilense*

O presente trabalho foi desenvolvido entre os meses de fevereiro e novembro de 2019, sendo realizadas 2 instalações. As miniestacas foram obtidas a partir de minicepas de *Pinus taeda* L. mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Propagação de Espécies Florestais pertencente a Embrapa Florestas, Colombo (PR). Estas minicepas, com 3 anos de idade e de origem seminal (sementes oriundas da empresa Westrock) foram cultivadas em canaletão contendo areia lavada e fertilização com solução nutritiva via gotejamento, em sistema semi hidropônico.

Os ramos foram coletados no período da manhã e mantidos em recipiente com água, a fim de manter a turgescência das células vegetais até o transporte para o Laboratório de Macropropagação, Departamento de Botânica, UFPR. As miniestacas foram confeccionadas com 6 cm de comprimento, mantendo 1/3 das acículas na porção superior, com corte em bisel na região basal e corte reto acima da última gema apical.

As bases das miniestacas, com exceção do tratamento controle (T1), foram imersas nas soluções de reguladores vegetais e soluções bacterianas em meio DYG's líquido (Rodrigues Neto et al., 1986), conforme descrito abaixo:

T1 – imersão em água deionizada por 10 segundos;

T2 – imersão em IBA 2000 mg L<sup>-1</sup> por 10 segundos;

T3 - imersão em IBA 4000 mg L<sup>-1</sup> por 10 segundos;

T4 - imersão em IBA 6000 mg L<sup>-1</sup> por 10 segundos;

T5 – imersão em suspensão de *A. brasilense* estirpe 2083 por 60 segundos;

T6 – imersão em suspensão de *A. brasilense* estirpe 2084 por 60 segundos;

T7 – imersão em suspensão de *A. brasilense* estirpe 2083+2084 por 60 segundos.



A solução bacteriana foi preparada com 96 horas de antecedência, pois as estirpes 2083 e 2084 de *Azospirillum brasilense*, pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas, encontravam-se armazenadas em óleo mineral e precisaram ser repicadas para meio DYG's sólido (2 g L<sup>-1</sup> glicose; 2 g L<sup>-1</sup> ácido málico; 1,5 g L<sup>-1</sup> peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico e 15 g L<sup>-1</sup> ágar). Em seguida, colônias bacterianas foram inoculadas em meio DYG's líquido (sem adição de ágar), permanecendo 48h no shaker, com temperatura a 28±2°C e agitação a 150 rpm. As soluções hidroalcolicas (50%) de ácido indol-3-butírico (IBA), da marca comercial Merck®, foram preparadas no momento da imersão das miniestacas.

O plantio foi realizado em tubetes de polipropileno com capacidade de 53 cm<sup>3</sup> preenchidos com vermiculita de granulometria fina e substrato comercial Tropstrato® (proporção 1:1) e mantidos em casa de vegetação com nebulização intermitente automatizada, acionada das 6h às 22h, com 30 segundos de irrigação em intervalos de 15 minutos, umidade relativa do ar em torno de 80% e temperatura de 25 ± 2°C.

Após quatro meses da instalação do experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de miniestacas enraizadas (miniestacas vivas e que emitiram raízes de, no mínimo, 2 milímetros de comprimento), número de raízes por miniestaca (número de raízes adventícias formadas durante o período de permanência em casa de vegetação), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (em cm), porcentagem de miniestacas com calos (miniestacas vivas, sem raízes e com acúmulo de massa de células indiferenciadas na região basal), porcentagem de miniestacas vivas (miniestacas sem emissão de raízes e sem calos), porcentagem de miniestacas mortas (miniestacas com tecido vegetal necrosado), porcentagem de miniestacas com novas brotações e porcentagem de miniestacas que mantiveram as acículas iniciais.

Ambos os experimentos foram realizados segundo um delineamento inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 4 repetições de 20 miniestacas por unidade experimental. As variáveis foram analisadas seguindo a análise de variância pelo teste de Bartlett e as médias dos experimentos foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### 5.2.2 Miniestaquia de *Pinus taeda* L. com inoculação de bactérias endofíticas

O estudo em questão foi desenvolvido entre os meses de novembro de 2019 e julho de 2020, sendo realizadas duas instalações. As miniestacas foram obtidas a partir de minicepas de *Pinus taeda* L. mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Propagação de Espécies Florestais, Embrapa Florestas, Colombo (PR). As minicepas com três anos de idade foram produzidas a partir de mudas seminais e foram cultivadas em sistema de canaletão contendo areia lavada e fertilização com solução nutritiva por gotejamento.

Os ramos foram coletados no período da manhã e mantidos em recipiente com água, a fim de manter a turgescência das células vegetais até o transporte para o Laboratório de Macropropagação, Departamento de Botânica, UFPR. As miniestacas foram confeccionadas com 6 cm de comprimento e manutenção das acículas em 1/3 da porção superior, com corte em bisel na região basal e corte reto no ápice.

Os inóculos bacterianos foram preparados com 96 horas de antecedência à instalação do experimento. As estirpes de bactérias endofíticas isoladas de brotações *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (pertencentes a Coleção de Microrganismos da Embrapa Florestas e denominadas CNPF) foram repicadas para meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) e permaneceram em estufa de crescimento por 48 horas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, colônias bacterianas foram inoculadas em meio DYG's líquido (sem adição de ágar) e submetidas a crescimento em shaker por 48 horas com temperatura a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e rotação de 150 rpm, constituindo os inóculos bacterianos.

As miniestacas foram plantadas em tubetes com capacidade de  $53\text{ cm}^3$ , preenchidos com vermiculita de granulometria fina e substrato comercial Tropstrato®, em uma proporção 1:1. Seguido ao plantio, inoculou-se 1000  $\mu\text{L}$  das soluções na base das miniestacas, com exceção do tratamento controle (T1), como descrito a seguir:

T1 – aplicação de 1000  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril na base das miniestacas;

T2 a T28 – inoculação de 1000  $\mu\text{L}$  das soluções bacterianas nas bases das miniestacas. Os tratamentos foram enumerados na sequência das estirpes inoculadas, sendo respectivamente: CNPF 293, 295, 296, 298, 304, 305, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328 e 331.

Após a inoculação, os tubetes foram mantidos em casa de vegetação com nebulização intermitente automatizada (das 6h às 22h, com 30 segundos de irrigação com intervalos de 15 minutos), umidade relativa do ar por volta de 80% e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após quatro meses da instalação do experimento, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de miniestacas enraizadas (miniestacas vivas e que emitiram raízes de, no mínimo, 2 milímetros de comprimento), número de raízes por miniestaca (número de raízes adventícias formadas durante o período de permanência em casa de vegetação), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (em cm), porcentagem de miniestacas com calos (miniestacas vivas, sem raízes e com acúmulo de massa de células indiferenciadas na região basal), porcentagem de miniestacas vivas (miniestacas sem emissão de raízes e sem calos), porcentagem de miniestacas mortas (miniestacas com tecido vegetal necrosado), porcentagem de miniestacas com novas brotações e porcentagem de miniestacas que mantiveram as acículas iniciais.

Os dois experimentos foram realizados segundo um delineamento inteiramente casualizado, com 28 tratamentos e 4 repetições de 10 miniestacas por unidade experimental. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Bartlett e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### **5.2.3 Microestaquia de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* com inoculação de bactérias endofíticas**

O presente ensaio foi realizado de janeiro a março de 2021, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Florestas, Colombo (PR). Os explantes utilizados foram obtidos de brotações alongadas de *P. caribaea* var. *hondurensis* mantidas em meio de multiplicação *in vitro*, as quais foram seccionadas formando microestacas com aproximadamente 2 cm de comprimento.

O ensaio foi conduzido em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio básico de WV5 (Coke, 1996) com metade da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , exclusão de macro e micronutrientes, 6 g/L ágar, 10 g/L sacarose e 0,5 g/L carvão ativado. Este

meio teve pH ajustado para 5,8 e, em seguida foi autoclavado sob temperatura de 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos, antes do uso.

Para a inoculação, onze isolados de bactérias endofíticas de *P. caribaea* var. *hondurensis* (denominados CNPF) foram selecionados conforme resultados prévios obtidos em ensaios de germinação (Capítulo II) e miniestaquia (Capítulo III) e, em seguida, repicados para meio DYG's sólido (Rodrigues Neto et al., 1986), permanecendo na estufa de crescimento por 48 horas a 28±2°C. Colônias isoladas foram inoculadas em meio DYG's líquido, no qual não houve a adição de ágar, e submetidas a crescimento em shaker por 48 horas com temperatura a 28±2°C e rotação de 150 rpm.

O tratamento controle consistiu na subcultura direta de microestacas no meio de cultura. Para os demais tratamentos foram utilizados palitos de madeira estéreis, os quais foram imersos nas suspensões bacterianas e perfuraram levemente o meio de cultura. Ao local das perfurações foram inoculadas as microestacas, distribuídas nos seguintes tratamentos:

- T1 – microestacas em meio de cultura controle (sem isolado bacteriano);
- T2 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 297;
- T3 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 300;
- T4 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 303;
- T5 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 304;
- T6 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 305;
- T7 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 307;
- T8 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 311;
- T9 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 312;
- T10 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 314;
- T11 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 317;
- T12 – microestacas em meio de cultura inoculado com a estirpe CNPF 321.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23±2°C e intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ .

Decorrido um mês do ensaio, avaliou-se a porcentagem de microestacas enraizadas (explantes vivos e com emissão de raízes de, no mínimo, 1 mm de comprimento), microestacas vivas (explantes que não emitiram raízes e sem acúmulo de massa de células indiferenciadas na região basal), microestacas mortas (explantes necrosados), microestacas com crescimento bacteriano no meio de cultura,

microestacas com emissão de novos brotos, número de brotos por explante e comprimento médio das microestacas.

Os dois ensaios realizados seguiram um delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e 20 repetições cada, contendo uma unidade amostral por tubo de ensaio. A experimentação foi repetida dentro do prazo de 30 dias e foram utilizados os valores médios para a análise estatística. Os resultados obtidos foram comparados quanto à variância pelo teste de Bartlett e as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Miniestaquia de *Pinus taeda* L. com inoculação de *Azospirillum brasilense*

Pelos resultados obtidos, constatou-se que os tratamentos não apresentaram diferenças a níveis de 1% ou 5% de significância (Anexo 5) para as variáveis miniestacas enraizada (ME), número médio de raízes/miniestaca (NR), comprimento médio de raízes/miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM) e miniestacas com brotações (MB) (Tabela 6).

**TABELA 6 –** MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (IBA) E DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*. Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamento	%ME	NR	CM	%MC	%MV	%MM	%MMA	%MB
Controle	5,0 a	1,50 a	3,57 a	40,00 a	31,25 a	23,75 a	38,75 a	26,25 a
IBA 2000	8,75 a	1,75 a	5,24 a	50,00 a	22,50 a	18,75 a	38,75 a	25,00 a
IBA 4000	11,25 a	2,25 a	6,30 a	48,75 a	26,25 a	13,75 a	40,00 a	22,50 a
IBA 6000	8,75 a	1,75 a	7,33 a	65,00 a	16,25 a	10,00 a	25,00 ab	15,00 a
AZO 2083	13,75 a	3,50 a	11,15 a	67,50 a	11,25 a	7,50 a	23,75 ab	30,00 a
AZO 2084	13,75 a	3,00 a	10,93 a	53,75 a	18,75 a	13,75 a	16,25 b	27,50 a
AZO 2083 + 2084	15,00 a	3,25 a	6,89 a	47,50 a	22,5 a	15,00 a	7,50 b	33,75 a

Fonte: Baldin (2021). Tratamentos: Controle (água destilada estéril); IBA 2000 (2000 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico); IBA 4000 (4000 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico); IBA 6000 (6000 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico); AZO 2083 (inoculação de *A. brasilense* 2083); AZO 2084 (inoculação de *A. brasilense* 2084); AZO 2083+2084 (inoculação de *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a variável miniestacas que mantiveram as acículas iniciais (MMA) (Tabela 6), os tratamentos controle, IBA 2000 mg L<sup>-1</sup> e IBA 4000 mg L<sup>-1</sup> apresentaram superioridade estatística em relação aos tratamentos AZO 2084 e AZO 2083+2084, porém não diferiram estatisticamente de IBA 6000 mg L<sup>-1</sup> e AZO 2083. A análise de variância demonstrou diferença a um nível de 1% de significância para esta variável.

Em comparação com o percentual de enraizamento, os tratamentos com maiores valores de MMA apresentaram os menores valores numéricos de enraizamento (Tabela 6). Tais resultados são contrários ao apresentado por Duarte et al. (2020) e Fragoso et al. (2015), onde afirma-se que a presença de folhas favorece

o processo rizogênico por atuar na translocação e no fornecimento de carboidratos e hormônios vegetais, que são compostos indispensáveis e estritamente necessários para o enraizamento. Os carboidratos em si não possuem funções regulatórias efetivas à rizogênese, mas fornecem energia para a síntese de substâncias fundamentais para a indução do sistema radicial adventício (Xavier et al., 2003; Fragoso et al., 2015; Duarte et al., 2020).

Ao se tratar de folhas, o tamanho das mesmas faz-se fator importante no momento da confecção das miniestacas e no desenvolvimento do sistema radicial, pois estas atuam na manutenção do equilíbrio entre fotossíntese e transpiração. Quando as folhas são mantidas inteiras, estas apresentam maior perda de água, menor atividade fotossintética e, conseqüentemente, menor síntese de carboidratos. Já a presença de folhas com tamanho muito reduzido ou a ausência das mesmas gera malefícios ao enraizamento, pois a síntese de carboidratos e metabólitos é prejudicada e o tecido vegetal pode acabar necrosando, aumentando a mortalidade do material vegetativo (Fragoso et al., 2015).

Para Singh e Ansari (2014), o estímulo à formação de raízes adventícias provém da interação entre fatores internos e externos, como o tratamento com auxinas exógenas ou outros compostos que atuam propriamente na promoção da rizogênese. De tal modo, a coinoculação das duas estirpes de *A. brasilense* (AZO 2083+2084) favoreceu o enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L., atingindo superioridade numérica com 15,0% de enraizamento, seguido dos tratamentos AZO 2083 e AZO 2084 com 13,75% de enraizamento (Tabela 6). Diante disso, constatou-se que a inoculação de *A. brasilense* contribuiu positivamente para a rizogênese de miniestacas herbáceas de *Pinus taeda* L. (Figura 13), uma vez que apresentou maiores porcentagens que o tratamento controle (5,0%) e os tratamentos com aplicação de ácido indol-3-butírico (IBA).

Resultados semelhantes ao enraizamento foram observados para as variáveis número médio de raízes (NR) e comprimento médio de raízes (CM), que determinam a qualidade da raiz formada. Houve um benefício da rizogênese pela inoculação com *A. brasilense*, mesmo não sendo observada diferença estatística. Em relação ao NR, AZO 2083 proporcionou um crescimento médio de 3,5 raízes por miniestaca de *Pinus taeda* L., enquanto o tratamento controle apresentou 1,5 raiz por miniestaca. O uso de ácido indol-3-butírico (IBA) favoreceu numericamente o número de raízes por miniestaca em relação ao controle (IBA 2000 mg L<sup>-1</sup> – 1,75; IBA 4000 mg L<sup>-1</sup> – 2,25;

IBA 6000 mg L<sup>-1</sup> – 1,75), porém apresentou valores numericamente inferiores aos tratamentos bacterianos. As raízes apresentaram um comprimento médio de 11,15 e 10,93 centímetros para AZO 2083 e AZO 2084, respectivamente. Já a coinoculação AZO 2083+2084 ocasionou uma redução numérica do comprimento de raízes (6,89 cm), indicando que a ação conjunta das estirpes bacterianas pode ter ocasionado uma maior síntese auxínica nos tecidos e comprometido o crescimento radicial. Para o tratamento controle foi obtido um comprimento médio de 3,57 centímetros, valor superado pelo restante dos tratamentos, embora sem diferença estatística entre eles.

**FIGURA 13** – MINIESTACAS ENRAIZADAS DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A APLICAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO (IBA) E DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021). Legenda: A – miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. com aplicação de IBA 4000 mg L<sup>-1</sup>; B – miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. inoculada com *A. brasilense* estirpe 2083; C – miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. inoculada com *A. brasilense* estirpe 2084.

Informações apresentadas por Spaepen et al. (2007) reforçam que os benefícios proporcionados por bactérias diazotróficas estão relacionados, em sua grande maioria, à produção de fitohormônios, não apenas auxinas, mas também giberelinas e citocininas, que são capazes de estimular o crescimento tanto da parte radicial quanto da parte aérea, como foi observado no presente estudo com



miniestacas de *P. taeda* L. Para Rosa et al. (2018), o efeito do IAA microbiano é similar ao promovido por reguladores vegetais, sendo possível a substituição desses compostos químicos por bioinoculantes constituídos por esse grupo de bactérias. Deste modo, diversas estirpes de *A. brasilense* têm sido empregadas como bioinoculantes e fitoestimuladores em culturas agrícolas para aumentar a produtividade dos plantios e, de modo sustentável, substituir agentes químicos por compostos naturais com efetividade semelhante.

A síntese auxínica por *A. brasilense* atua diretamente na emissão de raízes adventícias e alongamento das mesmas, contribuindo para uma maior sobrevivência e desenvolvimento das mudas (Baudoin et al., 2010; Duarte et al., 2020). Castro (1979) e Mohite (2013) relatam que as auxinas, independente da sua origem, promovem efeitos no crescimento e desenvolvimento do sistema radicial pelo processo de acidificação da parede celular vegetal. Concomitantemente, ocorre um aumento do potencial osmótico e da permeabilidade à água, diminuindo a pressão da parede celular e estimulando a alongação celular.

Com base nos benefícios citados, fornecidos estes pela inoculação desta bactéria, diversos estudos têm sido realizados com espécies vegetais diversas. Mariosa et al. (2017) observaram que a utilização de bactérias promotoras de crescimento em plantas, como *A. brasilense*, incrementou o comprimento das raízes formadas, número de pelos radiculares e raízes laterais em oliveira (*Olea europeae* L.). Já Duarte et al. (2020) observaram que a aplicação de *Azospirillum* sp., isolado ou associado com reguladores vegetais, pode potencializar o enraizamento de propágulos vegetativos, aumentar a eficiência e reduzir custos na produção de mudas de jasmim-amarelo (*Jasminum mesnyi* Hance).

Em relação ao emprego das soluções hidroalcoólicas de IBA, foi observada uma superioridade numérica na taxa de enraizamento para IBA 4000 mg L<sup>-1</sup> em relação a 2000 mg L<sup>-1</sup> e 6000 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 6), o que indica que as respostas fisiológicas responsáveis pela rizogênese foram mais significativas para IBA 4000 mg L<sup>-1</sup>, enquanto para as demais concentrações foi observada uma diminuição do potencial rizogênico. A aplicação exógena de auxinas sintéticas pode ocasionar um aumento dos níveis hormonais endógenos nos tecidos vegetais acima das concentrações ideais e, embora atuem no aumento da elasticidade das paredes celulares e divisão celular, podem levar a uma diminuição do potencial rizogênico e crescimento vegetal.

Assim, os valores numéricos inferiores observados para 6000 mg L<sup>-1</sup> de IBA podem estar relacionados a um comprometimento na ocorrência do processo rizogênico nessa faixa de concentração, a partir da qual o crescimento vegetal e desenvolvimento das raízes foram afetados (Singh e Ansari, 2014; Fragoso et al., 2015). Segundo Taiz et al. (2017), as respostas fisiológicas das plantas em relação à auxina endógena ou exógena são variáveis de acordo com o tecido vegetal e concentração aplicada do regulador vegetal. Até uma determinada concentração, a auxina pode aumentar consideravelmente a resposta rizogênica. Entretanto, quando aplicada em elevadas concentrações, pode ocasionar efeitos inibitórios e toxidez aos tecidos vegetais (Lattuada et al., 2011; Sauer et al., 2013; Taiz et al., 2017).

Em estudos já realizados, o uso de IBA em *Pinus taeda* L. ocasionou efeito deletério nas taxas de enraizamento e até mesmo ausência da formação de raízes. Tais resultados sugerem que a aplicação desse regulador vegetal é desnecessária ao enraizamento dessa espécie florestal, possivelmente devido a uma limitação endógena, como a presença de inibidores de enraizamento e ausência de receptores específicos de auxinas (Greenwood e Weir, 1994; Alcantara et al., 2008). Greenwood et al. (2001) evidenciaram que a falta de competência de enraizamento em estacas de *Pinus taeda* L. deve-se, majoritariamente, à inaptidão das células vegetais em formar meristemas radiciais em resposta às auxinas exogenamente aplicadas.

Na miniestaquia, os propágulos obtidos são provenientes de material vegetal fisiologicamente rejuvenescido. Esses propágulos mais juvenis tendem a apresentar melhor qualidade e maior rapidez no desenvolvimento do sistema radicial adventício. O rejuvenescimento baseia-se na reversão do estágio maduro para o juvenil, podendo ser realizado, de modo geral, por técnicas seriadas de propagação vegetativa ou podas drásticas (Hartmann et al., 2002; Wendling et al., 2014; Bavaresco et al., 2017). Deste modo, observando que as taxas de enraizamento foram baixas (inferiores a 13,75%), é possível deduzir que o material utilizado, proveniente de minijardim clonal estabelecido há 3 anos e com podas frequentes, não se encontrava fisiologicamente rejuvenescido.

Em *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, a aplicação de ácido naftalenoacético (NAA) e ácido indol-3-butírico (IBA) foi eficaz na promoção do crescimento radicial. Entretanto, NAA em concentrações elevadas apresentaram os menores valores de enraizamento, sugerindo a ocorrência de efeitos fitotóxicos (Henrique et al., 2006). De acordo com Hartmann et al. (2002) e Vander Krieker et al.

(1992), IBA encontra-se atualmente como a melhor auxina para uso em técnicas de propagação vegetativa, pois apresenta baixa toxicidade em uma ampla faixa de concentrações e alta competência na promoção do enraizamento em várias espécies vegetais. A aplicação de IBA, em miniestacas de *Eucalyptus cloeziana* induziu consideravelmente o enraizamento adventício, apresentando resultados superiores nas menores concentrações testadas; já o NAA, em contrapartida, não influenciou o enraizamento das miniestacas (Almeida et al., 2007).

A definição da concentração ideal de IBA a ser empregada nos propágulos vegetativos é dependente da espécie utilizada e dos hormônios vegetais sintetizados endogenamente às plantas (Ertuck et al., 2010). Assim, a formação e o desenvolvimento do sistema radicial adventício em materiais propagados encontram-se sobre controle genético, sendo a espécie fator determinante à indução de raízes, e hormonal, pela síntese endógena de auxinas e outros hormônios vegetais (Ertuck et al., 2010; Mariosa et al., 2017).

A presença de calos geralmente é atribuída às espécies consideradas difíceis de enraizar, como no caso de *Pinus taeda* L. Calos são massas irregulares de células parenquimáticas em variados estádios de lignificação, através dos quais, reiteradamente, ocorre a emergência de raízes adventícias (Hartmann et al., 2002). Pelo estudo realizado, observou-se que valores superiores de calogênese foram registrados para os tratamentos AZO 2083 (67,5%) e IBA 6000 mg L<sup>-1</sup> (65,0%).

Para miniestacas mortas (MM) (Tabela 6), mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, o maior valor foi atribuído ao tratamento controle, indicando que a ausência de IBA e *A. brasilense* ocasionou maior necrose dos tecidos. A menor mortalidade foi encontrada em AZO 2083, que apresentou 7,5% de miniestacas mortas. Contrariamente, para miniestacas vivas (MV) foram observados maiores valores para o tratamento controle (31,25%) e IBA 4000 (26,25%), sem diferença estatística com os demais tratamentos. A variável MV corresponde à complementação entre ME, MC e MM (Tabela 6).

Novas brotações (MB) foram observadas em maior quantidade, embora sem diferenças estatísticas, nos tratamentos com inoculação de *A. brasilense*: 33,75% para AZO 2083+2084; 30,0% para AZO 2083; e, 27,5% para AZO 2084 (Tabela 6). Tais resultados indicam a capacidade dessas bactérias em promover o crescimento vegetativo, contribuindo não apenas no enraizamento, mas também no desenvolvimento da parte aérea. De acordo com Somkuwar et al. (2011), o

desenvolvimento de novas brotações pode ser influenciado pela presença de gemas axilares, emprego de reguladores vegetais, temperatura, fitossanidade das plantas matrizes e fornecimento de energia pela fotossíntese.

De acordo com Patten e Glick (1996), Bottini et al. (2004) e Zhao (2010), o gênero *Azospirillum* gera resultados eminentes no crescimento e alterações morfológicas das raízes, como o aumento do número, comprimento e pelos radiculares, o que resulta em uma melhor absorção de água e nutrientes. Desta forma, tanto a aplicação de IBA quanto a microbiolização auxiliaram a formação de um sistema radicial de melhor qualidade.

### **5.3.2 Miniestquia de *Pinus taeda* L. com inoculação de bactérias endofíticas**

Os tratamentos nos quais as bactérias endofíticas foram inoculadas exibiram, em sua grande parte, incrementos numéricos na porcentagem de miniestacas enraizadas, assim como no número de raízes adventícias e no comprimento médio das raízes formadas (Tabela 7), quando relacionados com o tratamento testemunha, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os tratamentos CNPF 311 e CNPF 316 foram considerados os mais eficazes no enraizamento (Figura 13), ambos com 12,50% de miniestacas enraizadas. As estirpes CNPF 316, CNPF 321 e CNPF 328 destacaram-se numericamente como os tratamentos mais promissores para o número de raízes (2,8 raízes/miniestaca). Já para comprimento médio das raízes, as estirpes CNPF 307 e CNPF 316 apresentaram os maiores valores numéricos: 10,30 cm e 11,02 cm, respectivamente (Figura 14). Ertuck et al. (2010) relatou que *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. e *Comamonas* sp. aumentaram o percentual de enraizamento, o número de raízes principais formadas, comprimento e diâmetro das raízes adventícias, qualidade morfológica e peso seco das raízes em propágulos vegetativos de kiwi (*Actinidia deliciosa*).

Em espécies florestais, Mafia et al. (2009) salientaram que inóculos bacterianos promoveram incrementos consideráveis no enraizamento e na biomassa radicial de miniestacas de clone híbrido de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). Outrora, o emprego de isolados bacterianos, principalmente *Bacillus subtilis*, em miniestacas de eucalipto demonstrou a capacidade dos mesmos em incrementar a emissão de raízes, biomassa radicial e aérea, assim como viabilizar o controle biológico de doenças do eucalipto (Zarpelon, 2007). Díaz et al. (2009) constataram

que a inoculação bacteriana em *Eucalyptus globulus* acentuou o crescimento radicial, a emissão de raízes secundárias mais finas e mais volumosas e massa fresca e seca de raízes. Igualmente, Teixeira et al. (2007) constataram um incremento de 219% no índice de enraizamento e 223% na biomassa radicial para a inoculação com *Bacillus subtilis* em relação ao tratamento testemunha para miniestacas de *Eucalyptus grandis*.

A calogênese foi estatisticamente superior para CNPF 322 (37,5%), diferindo do tratamento controle (7,5%) e das estirpes CNPF 312 e CNPF 316, ambas com 5,0% de calos (Tabela 7). Segundo Hartmann et al. (2002), o desenvolvimento de calosidades é comumente verificado na cicatrização de feridas vegetais, como ocorre no processo de confecção de miniestacas. As células parenquimáticas não especializadas dos calos podem diferenciar-se em tecidos meristemáticos e originar primórdios de raízes, sendo possível a dedução de que a formação de calos é um processo fisiológico que antecede o enraizamento adventício, embora sejam fenômenos independentes entre si. Assim, tendo em vista que raízes adventícias frequentemente emergem através dos calos, os altos percentuais de calosidades verificados nos tratamentos com a inoculação de bactérias endofíticas podem indicar uma possível emergência radicial.

Quanto à variável miniestacas mortas (MM) (Tabela 7), 70,4% dos isolados bacterianos atingiram valores numéricos superiores ou iguais ao tratamento controle (30,0%), indicando que os inóculos aumentaram a necrose tecidual, embora os tratamentos não difiram estatisticamente entre si. A estirpe CNPF 323 alcançou o maior valor de miniestacas mortas (45,0%).

**TABELA 7 –** MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	%ME	NR	CM	%MC	%MV	%MM	%MMA	%MB
<b>Controle</b>	2,5 a	1,0 a	2,14 a	7,5 bc	60,0 a	30,0 a	50,0 ab	37,5 ab
<b>CNPF 293</b>	10,0 a	2,0 a	5,15 a	20,0 abc	40,0 ab	30,0 a	47,5 abc	27,5 ab
<b>CNPF 295</b>	7,5 a	1,0 a	4,62 a	17,5 abc	35,0 ab	40,0 a	45,0 abc	27,5 ab
<b>CNPF 296</b>	7,5 a	2,0 a	4,74 a	32,5 ab	35,0 ab	25,0 a	45,0 abc	47,5 a
<b>CNPF 298</b>	5,0 a	1,5 a	5,18 a	20,0 abc	42,5 ab	32,5 a	47,5 abc	32,5 ab
<b>CNPF 304</b>	2,5 a	0,3 a	0,23 a	22,5 abc	35,0 ab	40,0 a	37,5 abc	17,5 b
<b>CNPF 305</b>	2,5 a	0,3 a	6,25 a	30,0 abc	32,5 ab	35,0 a	35,0 abc	25,0 ab
<b>CNPF 307</b>	10,0 a	2,3 a	10,30 a	25,0 abc	25,0 b	40,0 a	37,5 abc	30,0 ab
<b>CNPF 308</b>	7,5 a	1,0 a	3,80 a	15,0 abc	37,5 ab	40,0 a	42,5 abc	22,5 ab
<b>CNPF 310</b>	10,0 a	1,0 a	1,03 a	32,5 ab	27,5 ab	30,0 a	42,5 abc	30,0 ab
<b>CNPF 311</b>	12,5 a	2,3 a	7,99 a	27,5 abc	27,5 ab	32,5 a	50,0 ab	25,0 ab
<b>CNPF 312</b>	10,0 a	1,8 a	5,15 a	5,0 c	57,5 ab	27,5 a	42,5 abc	35,0 ab
<b>CNPF 313</b>	2,5 a	0,3 a	0,13 a	22,5 abc	42,5 ab	32,5 a	55,0 a	30,0 ab
<b>CNPF 314</b>	2,5 a	1,3 a	4,75 a	20,0 abc	37,5 ab	40,0 a	30,0 bc	20,0 b
<b>CNPF 315</b>	2,5 a	1,3 a	1,56 a	22,5 abc	52,5 ab	22,5 a	57,5 a	37,5 ab
<b>CNPF 316</b>	12,5 a	2,8 a	11,02 a	5,0 c	60,0 a	22,5 a	45,0 abc	40,0 ab
<b>CNPF 317</b>	2,5 a	1,3 a	1,73 a	25,0 abc	32,5 ab	40,0 a	47,5 abc	22,5 ab
<b>CNPF 318</b>	7,5 a	1,5 a	3,36 a	15,0 abc	55,0 ab	22,5 a	52,5 ab	35,0 ab
<b>CNPF 319</b>	5,0 a	1,5 a	3,70 a	25,0 abc	42,5 ab	27,5 a	57,5 a	40,0 ab
<b>CNPF 320</b>	5,0 a	1,5 a	3,45 a	25,0 abc	37,5 ab	32,5 a	52,5 ab	25,0 ab
<b>CNPF 321</b>	10,0 a	2,8 a	5,25 a	27,5 abc	35,0 ab	27,5 a	57,5 a	40,0 ab
<b>CNPF 322</b>	7,5 a	2,3 a	4,43 a	37,5 a	32,5 ab	22,5 a	40,0 abc	40,0 ab
<b>CNPF 323</b>	2,5 a	1,0 a	4,16 a	22,5 abc	30,0 ab	45,0 a	25,0 c	20,0 b
<b>CNPF 324</b>	5,0 a	0,5 a	0,25 a	22,5 abc	40,0 ab	32,5 a	47,5 abc	27,5 ab
<b>CNPF 325</b>	2,5 a	0,3 a	3,43 a	25,0 abc	40,0 ab	32,5 a	50,0 ab	22,5 ab
<b>CNPF 326</b>	5,0 a	1,3 a	3,23 a	22,5 abc	30,0 ab	42,5 a	37,5 abc	30,0 ab
<b>CNPF 328</b>	10,0 a	2,8 a	8,30 a	22,5 abc	35,0 ab	32,5 a	45,0 abc	22,5 ab
<b>CNPF 331</b>	2,5 a	1,0 a	4,09 a	20,0 abc	40,0 ab	37,5 a	47,5 abc	20,0 b

Fonte: Baldin (2021). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 0,5% de probabilidade.

Para miniestacas vivas (MV), o tratamento controle e CNPF 316 (60,0% em ambos) não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, com exceção da estirpe CNPF 307 (25,0%). Por meio desses dados, verificou-se que a inoculação bacteriana gerou menores valores de miniestacas vivas, uma vez que esta variável abrange a complementação de miniestacas entre ME, MC e MM (Tabela 7).

O desenvolvimento de novos brotos foi estatisticamente superior para CNPF 296 (47,5%), valor o qual foi estatisticamente superior aos alcançados por CNPF 304, CNPF 314, CNPF 323 e CNPF 331 e semelhante ao restante dos tratamentos. Por meio dos resultados obtidos, inferiu-se que as bactérias endofíticas, de modo geral, beneficiaram o desenvolvimento aéreo das miniestacas, possivelmente devido à síntese microbiana de hormônios vegetais. Segundo Glick (2012), algumas bactérias, além da capacidade de síntese de auxinas, são aptas a sintetizar giberelinas e citocininas. Estes grupos hormonais estão relacionados ao alongamento celular e juvenilidade dos tecidos vegetais, o que proporciona melhorias no vigor, porte e longevidade das plantas.

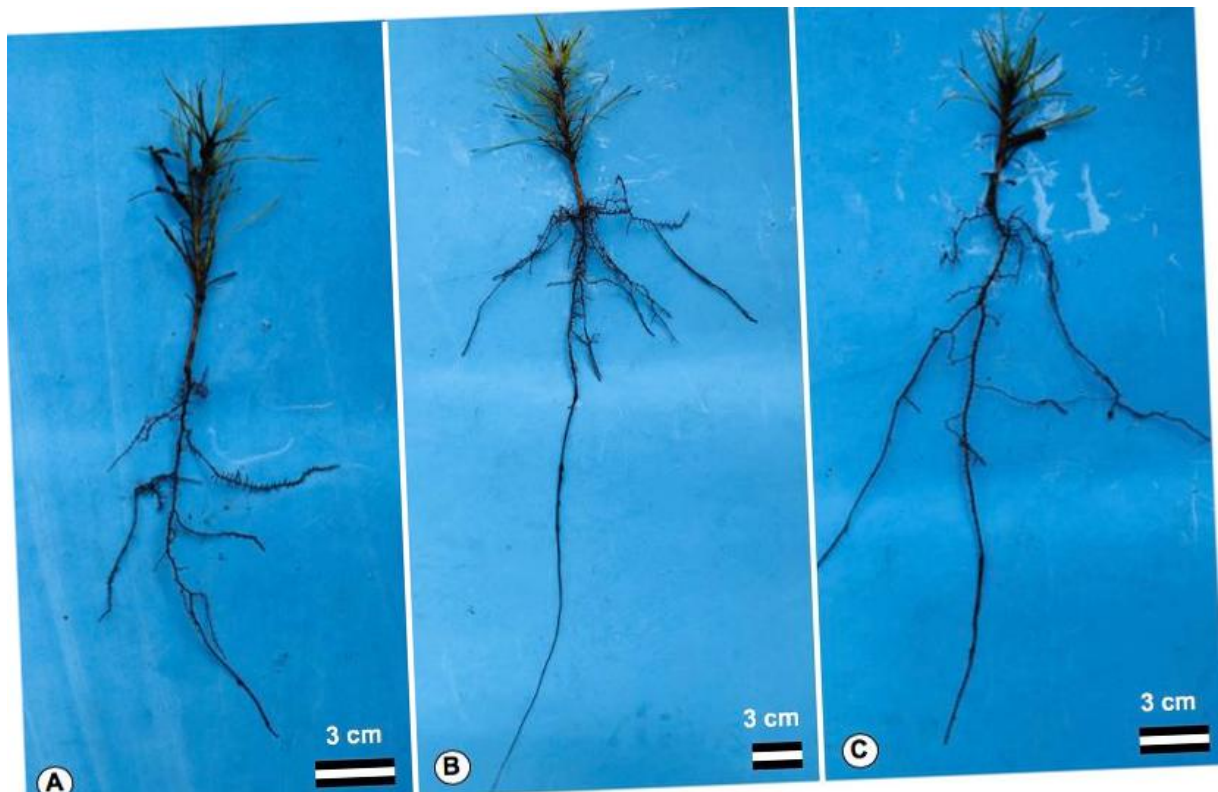
Uma série de mecanismos de ação vem sendo estudada para elucidar, cada dia mais, o processo de promoção de crescimento induzido por bactérias associativas. Já é sabido que a maioria das bactérias que habitam os tecidos vegetais ou a região da rizosfera são fixadoras de nitrogênio e sintetizadoras de fitohormônios, duas características estritamente relacionadas com o crescimento e desenvolvimento vegetal (Máfia et al., 2009). Conforme alegado por Zhao (2010) e Moreira e Araújo (2013), vários gêneros bacterianos encontram-se intimamente relacionados com o desencadeamento do processo rizogênico e as inúmeras modificações fisiológicas e morfológicas desencadeadas por este evento. As bactérias associativas, de modo geral, atuam no aumento do número e do comprimento das raízes adventícias, bem como no desenvolvimento acentuado da parte aérea. Um sistema radicular bem desenvolvido, com raízes laterais e adventícias, favorece a absorção de nutrientes e água do solo e, como efeito, mudas mais vigorosas em campo (Patten e Glick, 1996; Bottini et al., 2004; Oliveira et al., 2018).

No que diz respeito ao percentual de miniestacas que mantiveram as suas acículas iniciais (Tabela 7), os tratamentos CNPF 313 (55,0%), CNPF 315 (57,5%), CNPF 319 (57,5%) e CNPF 321 (57,5%) foram estatisticamente superiores aos tratamentos CNPF 314 (30,0%) e CNPF 323 (25,0%). Segundo estudos, a manutenção das folhas nos propágulos vegetativos oportuniza a rizogênese, pois a

taxa fotossintética e a reserva energética de carboidratos mantêm-se ativa para as atividades substanciais do ciclo da planta, como o enraizamento (Xavier et al., 2003; Fragoso et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram um crescente potencial do emprego de bactérias associativas à propagação clonal de espécies vegetais consideradas difíceis de enraizar, como é o caso de pinus. Os isolados bacterianos podem ascender o processo rizogênico e o crescimento vegetal, potencializando o rendimento das mudas enraizadas em viveiros clonais (Teixeira et al., 2007; Díaz et al., 2009).

**FIGURA 14** – MINIESTACAS ENRAIZADAS DE *Pinus taeda* L. SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021). Legenda: A – miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. inoculada com a estirpe CNPF 307; B - miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. inoculada com a estirpe CNPF 311; C - miniestaca enraizada de *Pinus taeda* L. inoculada com a estirpe CNPF 316.



### 5.3.3 Microestaquia de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* com inoculação de bactérias endofíticas

Por meio da análise de variância (ANOVA), apresentada no Anexo 7, verificou-se que as variáveis microestacas com contaminação bacteriana visível no meio de cultura (%MICV), número de brotações por microestaca (NBMI) e altura média final das microestacas (ALTM) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, ao passo que para a porcentagem de microestacas enraizadas (%MIE), microestacas vivas (%MIV) e microestacas mortas (MIM) não foram constatadas diferenças estatísticas.

Na Tabela 8 encontram-se as médias obtidas quanto ao comportamento das brotações de *P. caribaea* var. *hondurensis* perante a inoculação com as bactérias endofíticas isoladas da mesma espécie em questão.

**TABELA 8 –** MICROESTACAS ENRAIZADAS (%MIE), MICROESTACAS VIVAS (%MIV) E MORTAS (%MIM), MICROESTACAS COM CONTAMINAÇÃO VISÍVEL NO MEIO DE CULTURA (%MICV), NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR MICROESTACA (NBMI) E ALTURA MÉDIA DAS MICROESTACAS (ALTM) DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM DIFERENTES INÓCULOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS. Curitiba, PR, abril de 2021.

Tratamentos	%MIE	%MIV	%MIM	%MICV	NBMI	ALTM
<b>Controle</b>	0,0 a	95,0 a	5,0 a	65,0 b	2,6 abc	5,8 ab
<b>CNPF 297</b>	0,0 a	100,0 a	0,0 a	100,0 a	1,4 bc	5,7 ab
<b>CNPF 300</b>	0,0 a	100,0 a	0,0 a	100,0 a	2,9 ab	6,7 a
<b>CNPF 303</b>	0,0 a	100,0 a	0,0 a	100,0 a	3,1 a	5,1 ab
<b>CNPF 304</b>	0,0 a	95,0 a	5,0 a	100,0 a	1,6 abc	4,8 ab
<b>CNPF 305</b>	0,0 a	90,0 a	10,0 a	100,0 a	1,6 abc	5,0 ab
<b>CNPF 307</b>	0,0 a	100,0 a	0,0 a	100,0 a	1,1 c	4,8 b
<b>CNPF 311</b>	0,0 a	90,0 a	10,0 a	75,0 b	1,1 c	4,9 ab
<b>CNPF 312</b>	0,0 a	100,0 a	0,0 a	100,0 a	1,7 abc	4,4 b
<b>CNPF 314</b>	0,0 a	95,0 a	5,0 a	100,0 a	2,6 abc	4,9 ab
<b>CNPF 317</b>	0,0 a	90,0 a	10,0 a	100,0 a	2,6 abc	5,4 ab
<b>CNPF 321</b>	0,0 a	90,0 a	10,0 a	100,0 a	1,1 c	4,7 b

Fonte: Baldin (2021). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 0,5% de probabilidade.

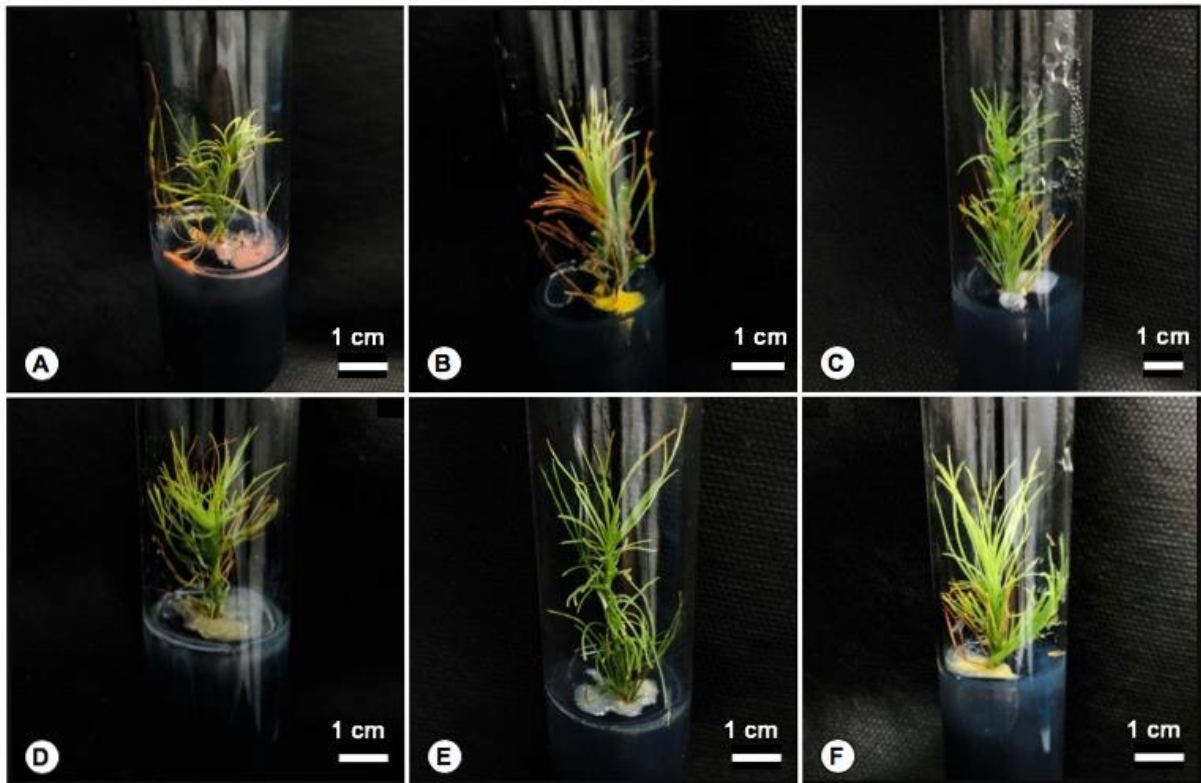
O enraizamento das microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis* foi nulo para todos os tratamentos avaliados (Tabela 8), possivelmente devido à dificuldade apresentada no processo rizogênico da espécie estudada. A inoculação bacteriana, nesse caso, não demonstrou ser eficiente ao incrementar o potencial rizogênico das brotações *in vitro*. Contrariamente ao apresentado no presente estudo, Orlikowska et

al. (2017) salientaram que *Burkholderia phytofirmans* contribuiu para um aumento das taxas de enraizamento em *Helleborus*, atingindo 100% com 6,9 raízes por muda e comprimento médio de 2,1 cm. Para mudas micropropagadas de *Cattleya loddigesii*, as bactérias endofíticas *Paenibacillus lentimorbus* e *Paenibacillus macerans*, ambas isoladas do meristema de orquídeas *Cymbidium eburneum* e sintetizadoras de IAA microbiano, aumentaram o comprimento de raízes formadas e ganhos em biomassa radicial e de parte aérea (Faria et al., 2013).

A micropropagação é uma das técnicas mais indicadas para reverter a maturação do material vegetal por um processo denominado como rejuvenescimento. Este processo baseia-se na reversão da maturidade das plantas, a qual ocorre por sucessivos subcultivos em meio de cultura, resultando no resgate da juvenilidade (Wendling et al., 2014). Tendo em vista que os explantes utilizados encontravam-se em um microjardim clonal estabelecido há aproximadamente 3 anos, com subcultivos realizados a cada 60 dias, e que não foi constatado o desenvolvimento de raízes adventícias, faz-se questionável o processo de rejuvenescimento. Isto é, possivelmente o material utilizado não apresentou reversão da maturidade e, portanto, não houve favorecimento da rizogênese.

Embora não tenha sido constatada a formação radicial em nenhum explante, a taxa de mortalidade das microestacas foi extremamente baixa, indicando que os isolados bacterianos contribuíram para uma maior sobrevivência dos explantes *in vitro*. De forma complementar, observou-se que todos os tratamentos com inóculos apresentaram colônias bacterianas em crescimento no meio de cultura, geralmente associadas ao propágulo vegetativo (Figura 15). Os menores valores de contaminação visível no meio de cultura foram encontrados para o tratamento controle (65,0%) e CNPF 311 (75,0%) (Tabela 8), diferindo estatisticamente do restante dos tratamentos. O tratamento controle apresentou contaminação bacteriana semelhante as encontradas nos demais tratamentos, indicando uma possível expressão das bactérias endofíticas do próprio explante no meio de cultura.

**FIGURA 15** – BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* COM EXPRESSÃO DE COLÔNIAS BACTERIANAS NO MEIO DE CULTURA. Curitiba, PR, abril de 2021.



Fonte: Baldin (2021). Legenda: A – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 314; B – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 304; C – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 305; D – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 317; E – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 311; F – brotação adventícia inoculada com estirpe bacteriana CNPF 307.

Em relação à variável número médio de brotações por microestaca (NBMI) (Tabela 8), foi possível observar um efeito positivo da bactéria CNPF 303 no aumento do número de brotações por microestaca (3,1 brotos/microestaca), diferindo estatisticamente das estirpes CNPF 297 (1,4), CNPF 307 (1,1), CNPF 311 (1,1) e CNPF 321 (1,1). Efeitos benéficos da inoculação bacteriana também foram percebidos para a variável altura das microestacas (ALTM) (Tabela 8), onde observou-se superioridade numérica da estirpe CNPF 300, com altura média de 6,7 cm. Tal tratamento diferiu de CNPF 307, CNPF 312 e CNPF 321 e foi estatisticamente semelhante aos resultados dos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram observados em estudo dirigido por Souza et al. (2016) e Weber et al. (2000), em que bactérias promotoras de crescimento promoveram um maior desenvolvimento da parte aérea e valores superiores de massa fresca em mudas micropropagadas de bananeira Prata Anã. Já Perez-Rosales et al. (2018) relataram que a bioinoculação *in*

*vitro* de Jojoca (*Simmondsia chinensis*) aumentou em até 82,5% o comprimento de parte aérea, além de favorecer o enraizamento dos explantes *in vitro*.

A inoculação com bactérias endofíticas favoreceu o alongamento das brotações de *P. caribaea* var. *hondurensis*, possivelmente pela capacidade de síntese de reguladores vegetais, como as citocininas. Glick (2012) relatou que a grande maioria das bactérias promotoras de crescimento em plantas sintetizam, além das auxinas, outros grupos hormonais, responsáveis pelo crescimento e juvenilidade dos tecidos vegetais. Um melhor desenvolvimento da parte aérea também foi verificado em plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) pela inoculação com 20 bactérias endofíticas, o que resultou em um maior crescimento e massa seca da parte aérea, altura das plantas e conteúdo nutricional das folhas (Baldotto et al., 2010). A bactéria endofítica *Bacillus* sp. apresentou incrementos em biomassa de parte aérea, número de brotações axilares e maior vigor de crescimento em plântulas micropropagadas de macieira cv. Gala (Tamošiūnė et al., 2018). Em trigo, a inoculação com bactérias endofíticas promoveu ganhos em parâmetros de crescimento, aumentando em 37,8% a massa seca de parte aérea em relação ao tratamento sem inoculação bacteriana (Emami et al., 2019). Por sua vez, Piotto (2013) observou que a interação entre microcepas de *Eucalyptus benthamii* e bactérias endofíticas beneficiou a multiplicação *in vitro* de explantes vegetais, bem como aumentou o número de brotações e vigor das plântulas.

A microbiotização de plântulas *in vitro* também pode proporcionar malefícios à cultura, uma vez que as bactérias podem competir com os explantes por nutrientes ou apresentar crescimento excessivo e causar necrose dos tecidos vegetais. Contudo, observou-se que, visualmente, todas as microestacas inoculadas apresentaram maior desenvolvimento e maior vigor em relação ao tratamento controle. Como dito anteriormente, os benefícios em crescimento podem estar relacionados com a síntese de hormônios vegetais e outros metabólitos que atuam na promoção do crescimento vegetal por inúmeras espécies bacterianas (Glick, 2012).

A síntese microbiana de IAA por bactérias associativas promotoras de crescimento vegetal e a interação das mesmas com plantas estabelecidas *in vitro* favorecem o desencadeamento do processo rizogênico, principalmente em espécies recalcitrantes, bem como o desenvolvimento do sistema radicial e de parte aérea e maior qualidade no estabelecimento das plântulas *in vitro*. Além disso, a interação biológica endofítica auxilia na superação de estresses abióticos das culturas *in vitro* e

contribui para alterações fenotípicas das plantas (Spaepen et al., 2007; Costa et al., 2018; Perez-Rosales et al., 2018). O emprego de bioinoculantes compostos por bactérias sintetizadoras de IAA aparece como uma estratégia biológica promissora para incrementar a qualidade das mudas micropropagadas, bem como o seu desenvolvimento e produtividade em campo após o processo de aclimação (Spaepen et al., 2007; Souza et al., 2016; Costa et al., 2018).

## 5.4 CONCLUSÕES

Nas condições que o presente estudo foi realizado, foi possível obter as seguintes conclusões:

- A aplicação de 4000 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico favoreceu o enraizamento e desenvolvimento radicial de miniestacas de *Pinus taeda* L.
- *A. brasilense* 2083 e *A. brasilense* 2084 favoreceram o enraizamento, número de raízes formadas e comprimento médio das raízes em miniestacas de *P. taeda* L., indicando a eficácia desses microrganismos na composição de bioinoculantes.
- Os isolados bacterianos contribuíram de modo benéfico ao enraizamento de miniestacas de *P. taeda* L., assim como no número de raízes formadas por miniestaca e o comprimento médio das raízes. Destacou-se a cepa CNPF 316, por apresentar os maiores valores para as três variáveis citadas.
- Em condições *in vitro*, a inoculação com as bactérias endofíticas não favoreceu o enraizamento de microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis*. Entretanto, as bactérias endofíticas contribuíram para uma maior sobrevivência dos explantes. As estirpes CNPF 300 e 303 proporcionaram um maior desenvolvimento da parte aérea, aumentando a altura e o número de brotações formadas.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS; K. C. Efeitos do ácido indolilbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 151-156, 2008.
- ALMEIDA, F. D. de; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ANDREJOW, G. M. P. **Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, 2006, 103 p.
- ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, Curitiba, Paraná, v. 39, n. 4, p. 897-903, 2009.
- ANTONELLI, P. O. **Estaquia de matrizes adultas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*.** Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, 2013, 91 p.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.
- BAUDOIN, E.; LERNER, A.; MIRZA; M. S.; ZEMRANY, H. E.; PRIGENT-COMBARET, C.; JURKEVICH, E.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; NAZARET, S.; OKON, Y.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene IpdC upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 219-226, 2010.
- BAVARESCO, L. G.; PASQUALI, R.; FLUMINHAN, A. Cultivo *in vitro* de explantes removidos de plantas cultivadas a campo visando à micropropagação de *Eucalyptus citriodora*. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 6, 2017.
- BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 497-503, 2004.
- BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp.** Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, 2006, 70 p.
- CANLI, F. A.; BOZKURT, S. Effects of indolebutyric acid on adventitious root formation from semi-hardwood cuttings of “Sarierik” plum. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 45-48, 2009.

CASTRO, P. R. C. Mecanismo de Ação Auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 36, p. 621-634, 1979.

COKE, J. E. **Basal nutriente medium for *in vitro* cultures of loblolly pines**. USA Patent, PI 5.534.433, 1996.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e Miniestaquia de Espécies Florestais Lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

DÍAZ, K.; VALIENTE, C.; MARTÍNEZ, M.; CASTILLO, M.; SANFUENTES, E. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 867-873, 2009.

DUARTE, M. M.; MORAES, R. F.; MARTIN, D. M.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Potencial de utilização de *Azospirillum brasilense* e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de jasmim-amarelo. **Advances in Forestry Science**, Cuiabá, v. 7, n. 1, p. 889-895, 2020.

EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A.; POURBABAEI, A.; ETESAMI, H.; SARMADIAN, F.; MOTESSHAREZADEH, B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 19804-19813, 2019.

ERTUCK, 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. **Biological Research**, v. 43, p. 91-98, 2010.

FARIA, D. C.; DIAS, A. C. F.; MELO, I. S.; COSTA, F. E. de C. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 217-221, 2013.

FRAGOSO, R. de O.; WITT, N. G. de P. M.; OBRZUT, V. V.; VALÉRIO, S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; STUEPP, C. A. Maintenance of leaves and indolebutyric acid in rooting of juvenile japanese flowering cherry cuttings. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 10, n. 1, p. 97-101, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012, 15 p.

GREENWOOD, M. S.; WEIR, R. J. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyl cuttings. **Tree Physiology**, Victoria, Canada, v. 15, p. 41-45, 1994.

GREENWOOD, M. S.; CUI, X.; XU, F. Response to auxin changes during maturation-related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinus taeda*) stem cuttings. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 373-380, 2001.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices**. 8th Edition. New York: Englewood Clippis, 2002, 880 p.



HENRIQUE, A.; CAMPINHOS, E. N.; ONO, E. O.; PINHO, S. Z. de. Effect of plant growth regulators in the rooting of *Pinus* cuttings. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 189-196, 2006.

LATTUADA, D. S.; SPIER, M. SOUZA, P. V. D. de. Pré-tratamento com água e doses de ácido indolbutírico para estaquia herbácea de pitangueiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2073-2079, 2011.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; SIQUEIRA, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 33, n. 5., p. 789-797, 2009.

MARIOSIA, T. de N.; MELLONI, E. G. P.; MELLONI, R.; FERREIRA, G. M. dos R.; DE SOUZA, S. M. P.; DA SILVA, L. F. de O. Rizobactérias e desenvolvimento de mudas a partir de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europae* L.). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 60, n. 4, p. 302-306, 2017.

MIRANDA, L. **Efeito de fitorreguladores e rizobactérias promotoras de crescimento na produção de mudas clonais de *Pinus taeda***. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO-PR), 2015, 59 p.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.

MOREIRA, A. L. de L.; ARAÚJO, F. F. de. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

OLIVEIRA, V. S. de; SILVA, C. dos S.; ARAÚJO, R. G. V. de; SILVA, C. E. da; NASCIMENTO, M. da S.; MONTALDO, Y. C.; SANTOS, T. M. C. dos; SILVA, J. M. do. Eficiência de bactérias endofíticas associadas a extrato indutor de enraizamento natural na cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Craibeiras de Agroecologia**, Rio Largo, v. 3, n. 1, 2018.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 487-508, 2017.

PANIGRAHI, S.; MOHANTY, S.; RATH, C. C. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with indole acetic acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. **South African Journal of Botany**, v. 7, n. 25, 2019.

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

PEREZ-ROSALES, E.; ALCARAZ-MELÉNDEZ, L.; PUENTE, M. E.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ZENTENO-SAVÍN, T.; MORALES-BOJÓRQUEZ, E. Endophytic bacteria isolated from wild jojoba [*Simmondsia chinensis* L. (Schneider)] roots improve *in vitro* propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 515-522, 2018.

PIOTTO, K. D. B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* maiden & cambage**. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Universidade de São Paulo, 2013, 158 p.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROSA, D. D.; VILLA, F.; SILVA, D. F. da; CORBARI, F. Rooting of semihardwood cuttings of olive: indolbutyric acid, calcium and *Azospirillum brasilense*. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 1, p. 34-40, 2018.

SAUER, M.; ROBERT, S. KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2565-2577, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SINGH, A.; ANSARI, S. A. Callus formation impedes adventitious rhizogenesis in air layers of broadleaved tree species. **Annals of Forest Research**, v. 57, n. 1, p. 47-54, 2014.

SOMKUWAR, R. G.; BONDAGE, D. D.; SURANGE, M. S.; RAMTEKE, S. D. Rooting behavior, polyphenol oxidase activity, and biochemical changes in grape rootstocks at different growth stages. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 35, p. 281-287, 2011.

SOUZA, G. L. O. D. de; SILVA, D. F. da; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; PEREIRA, M. C. T. Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2., 2016.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Fems Microbiology Review**, v. 31, p. 425-448, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**. 6. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017, 858 p.

TAMOŠIŪNĖ, I.; STANIENĖ, G.; HAIMI, P.; STANYS, V.; RUGIENIUS, R.; BANIULIS, D. Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. modulate apple shoot growth, cellular redox balance and protein expression under *in vitro* conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 889, 2018.

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

VANDER KRIEKEN, W. M.; BRETELER, H.; VISSER, M. H. M. The effect of the conversion of indolebutyric acid into indoleacetic acid on root formation on microcuttings of *Malus*. **Plant cell reports**, v. 33, p. 709-713, 1992.

XAVIER, A.; SANTOS, D. A. DOS; OLIVEIRA, M. L. de. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2277-2285, 2000.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, p. 473-486, 2014.

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus<sup>®</sup> no enraizamento e crescimento de eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, 2007, 82 p.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its roles in plant development. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 49-64, 2010.

## 6 CONCLUSÕES FINAIS

*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, apesar de mantidos por mais de três anos em condições *in vitro*, ainda possui uma representativa colonização endofítica em seus tecidos, o que sugere a grande importância destes microrganismos na sobrevivência dos explantes vegetais nestas condições. Foram isoladas 39 estirpes bacterianas neste estudo, as quais apresentam variado perfil genotípico e fenotípico, sendo identificados predominantemente os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. Todos os isolados bacterianos estudados testaram positivo para a síntese de ácido indol-3-acético (IAA) na presença e na ausência do aminoácido precursor L-triptofano. As estirpes CNPF 307 e CNPF 317 apresentaram superioridade na síntese de IAA.

Em condições germinativas, a imersão das sementes em água destilada não foi eficiente na germinação de *Pinus taeda* L. Em contraposto, a aplicação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contribuiu significativamente para a superação da dormência tegumentar das sementes de *P. taeda* L. e aumento das taxas germinativas. A inoculação com a bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* ocasionou a redução do tempo médio de germinação, aumento do índice de velocidade de germinação e ganhos em vigor e crescimento das plântulas de *P. taeda*. As bactérias endofíticas CNFP 300, CNPF 304, CNPF 305, CNPF 309, CNPF 320 e CNPF 328 compuseram inóculos competentes no incremento da germinabilidade, aumento da velocidade de germinação e diminuição do tempo médio de germinação de sementes de *P. taeda*.

Na propagação vegetativa via miniestquia, a aplicação de ácido indol-3-butírico (IBA) na concentração de 4000 mg L<sup>-1</sup> e das estirpes 2083 e 2084 de *Azospirillum brasilense* favoreceu, numericamente, o enraizamento e o desenvolvimento radicial de miniestacas de *P. taeda*. Os isolados bacterianos, principalmente a cepa CNPF 316, beneficiaram oportunamente o enraizamento de miniestacas de *P. taeda*, assim como o número médio de raízes formadas e o comprimento médio das raízes.

Em condições de propagação *in vitro*, a microbiotização não favoreceu o enraizamento dos explantes. A inoculação com as bactérias endofíticas contribuíram, de modo geral, para uma menor mortalidade das microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis*. As estirpes bacterianas CNPF 300 e CNPF 303 proporcionaram um

maior desenvolvimento em altura e número de novas brotações formadas, constituindo uma parte aérea com maior qualidade e vigor.

Ademais, as bactérias isoladas de *P. caribaea* var. *hondurensis* e *Azospirillum brasilense* apresentam-se como microrganismos eficientes na composição de bioinoculantes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas experimentações e resultados obtidos, utilizando estirpes de *Azospirillum brasilense* e de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *P. caribaea* var. *hondurensis*, foi possível constatar, ao longo desses 26 meses de pesquisa, que o desenvolvimento e crescimento vegetal estão relacionados com uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos às plantas. Todos os experimentos realizados responderam positivamente à microbiotização dos tecidos vegetais, sejam estes sementes, miniestacas ou microestacas.

O isolamento de bactérias endofíticas de *P. caribaea* var. *hondurensis* fez com que fosse percebida a considerável variedade de microrganismos no interior dos seus tecidos, sendo obtidos 39 isolados bacterianos com características fenotípicas diversas e identificados, maioritariamente, os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*.

A síntese microbiana de hormônios vegetais apresenta-se como uma ferramenta promissora à substituição de compostos químicos. Perante isso, a capacidade de sintetizar ácido indol-3-acético foi testada e verificada em todas as estirpes bacterianas estudadas, indicando que as mesmas possuem potencial de promoção do crescimento de plantas.

Para a germinação de sementes de *P. taeda*, o uso do peróxido de hidrogênio destacou-se pela capacidade de superação da dormência tegumentar e consequente aumento da germinabilidade. Quando em associação com a bactéria *Azospirillum brasilense* e as bactérias endofíticas, foram verificados benefícios ainda mais significativos, principalmente quanto ao crescimento e robustez das plântulas emergidas.

As diferenças quanto ao enraizamento adventício de miniestacas de *P. taeda* L. e microestacas de *P. caribaea* var. *hondurensis* indicam que o emprego das suspensões bacterianas compostas por *Azospirillum brasilense* e bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais de *P. caribaea* var. *hondurensis* promovem incrementos no potencial de enraizamento da espécie. No entanto, a promoção deste enraizamento foi baixa, e desta forma, ressalta-se a melhoria necessária deste processo.

Apesar da importância do uso de microrganismos promotores de crescimento em plantas e da sustentabilidade que estas fornecem aos plantios agrícolas, poucos

estudos ainda são realizados sobre este tema, sobretudo para espécies florestais. Assim, existe a necessidade de novas e contínuas pesquisas que correlacionem a biotização com a ocorrência de processos fisiológicos, morfológicos e anatômicos, a fim de identificar o modo de ação desses microrganismos nos tecidos vegetais.

## REFERÊNCIAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.JR. **Ethylene in plant biology**. 2.Ed. Academic Press, New York, 1992.
- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF 2013 Ano Base 2012**. Brasília, 2013.
- ABRANTES, F. L.; SÁ, M. E.; SOUZA, L. C. D.; SILVA, M. P.; SIMIDU, H. M.; ANDREOTTI, M.; BUZERRI, S.; VALÉRIO FILHO, W. V.; ARRUDA, N. Uso de regulador de crescimento em cultivares de feijão de inverno. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 148-154, 2011.
- AGUIAR, A. V.; SOUSA, V. A.; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E. Programa de melhoramento de pinus da Embrapa Florestas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Colombo, Paraná, 2011.
- ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS; K. C. Efeitos do ácido indolilbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 151-156, 2008.
- ALMEIDA, N. F. **Avaliação da qualidade da madeira de um híbrido de *Pinus elliottii* var. *Elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* para produção de lâminas e manufatura de compensados**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, 2011, 116 p.
- ALONI, R.; ALONI, E. LANGHANS, M.; ULLRICH, C. I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany Company**, Oxford University, 2006.
- ANDREJOW, G. M. P. **Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, 2006, 103 p.
- ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. Provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, Curitiba, Paraná, v. 39, n. 4, p. 897-903, 2009.
- ANTONELLI, P. O. **Estaquia de matrizes adultas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea***. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, 2013, 91 p.
- ARONI, A. S. **Avaliação da biomassa e qualidade da madeira do híbrido *Pinus tecunmannii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* pela técnica de atenuação da radiação gama do <sup>241</sup>Am**. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005, 155 p.



ASSUMPÇÃO, L. de C. **Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e seu potencial biotecnológico.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, 2008, 93 p.

BARBOSA, A. F. S.; SILVEIRA, L. A.; LEAL, P.L. Caracterização de rizobactérias associadas à *Melocactus conoideus* quanto a mecanismos de promoção de crescimento de plantas. **C&D-Revista Eletrônica da FAINOR**, Vitória da Conquista, v.10, n.3, p. 328-345, 2017.

BECHARA, F. C. **Restauração ecológica de restingas contaminadas por pinus no parque florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Santa Catarina, 2003, 136 p.

BERTOLINI, M. S. **Emprego de resíduos de *Pinus sp.* tratado com preservante CCB na produção de chapas de partículas homogêneas utilizando resina poliuretana à base de mamona.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade De São Paulo, 2011, 129 p.

BILA, J. M. **Classificação de sítios com base em fatores edáficos para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* na região de Prata, Minas Gerais.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, 2010, 77 p.

BORACIN, M. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R. Efeito de bactérias rizosféricas e fertilizantes no enraizamento de violeta africana. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 1, p. 366-375, 2016.

BOTIN, A. A.; CARVALO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, MT, v.13, n.1, p.83-96, 2015.

BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus spp.*** Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, 2006, 70 p.

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

CAIXETA, C. F. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal.** Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, 2015, 82 p.

CARMO, A. L. M. ***Fusarium* em sementes de pinus no brasil: distribuição, patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico.** Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, 2017, 89 p.

CARREIRA, M. R.; DIAS, A. A. Classificação visual de coníferas: análise da aplicação do método norte-americano às espécies de *Pinus sp.* plantadas no Brasil. **Scientia Forestalis** n. 67, p.78-87, 2005.

DA COSTA, F. S. S. **Bacillus thuringiensis** como endofíticos em algodão: **avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda***. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, 2014, 114 p.

DARIO, G. J. A.; MARTIN, T. N.; NETO, D. D.; MANFRON, P. A.; BONNECARRÈRE, R. A. G. Influência do uso de fitorregulador no crescimento da soja. **Revista da FZVA. Uruguaiana**, v. 12, n. 1, p. 63-70, 2005.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

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

DUARTE, M. M., MORAES, R. F.; DANIELA, M. M.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Potencial de utilização de *Azospirillum brasiliense* e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de jasmin-amarelo. **Advances in Forestry Science**, Cuiabá, v. 7, n. 1, p. 889-895, 2020.

FERREIRA, A.T. B. **Caracterização da estrutura anatômica do lenho, dos anéis de crescimento e dos canais de resina de árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. et Golf**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, 2009, 84 p.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.

FREITAS, M. L. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAIS, E.; LEMOS, S. V.; FERNANDES, A. C.; SEBBENN, A. M. Teste de procedências de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* aos 32 anos de idade em Bebedouro - SP. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 17-23, 2005.

GAMALERO, E.; GLICK, B. R. **Bacterial modulation of plant ethylene levels**. *Plant Physiology*, v. 169, p. 13-22, 2015.

GEORGIN, J. Plantio de *Pinus elliottii* em pequenas propriedades rurais no norte do Rio Grande do Sul. **Revista Monografias Ambientais (REMOA)**, v. 14, n. 3, p. 3341-3345, 2014.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, p.30-39, 2014.

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 97 p.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; IAREMA, L.; OTONI, W. C. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 521-532, 2014.

GUERREIRO, R. T. **Seleção de *Bacillus* spp. promotores de crescimento de milho**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), 2008, 56 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices**. 8th Edition. New York: Englewood Clippis, 2002, 880 p.

HERNÁNDEZ-SOBERANO, C.; RUÍZ-HERRERA, L. F.; VALENCIA-CANTERO, E. Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylophilus* M4-96 stimulate achene germination, *in vitro* growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Scientia Horticulturae**, v. 261, 2020.

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório IBÁ 2020**. São Paulo, 2020.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.4, p. 637-642, 2006.

LATOH, L. P. **Aspectos morfo-fisiológicos e metabolômicos no enraizamento de quatro espécies de *Tibouchina***. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, 2019, 155 p.

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B. de; RAMOS, A. P. S.; COSTA, D. P. da; FREIRE, F. J.; SOBRAL-KUKLINSKY, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 122-129, 2012.

MAFIA, R. G.; MARCHESI, H. P.; AUN, C. P. Avaliação de clones de eucalipto para resistência à ferrugem em condições de micropropagação. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 36, n. 5, p. 843-849, 2012.

MARIOSIA, T. de N.; MELLONI, E. G. P.; MELLONI, R.; FERREIRA, G. M. dos R.; DE SOUZA, S. M. P.; DA SILVA, L. F. de O. Rizobactérias e desenvolvimento de mudas a partir de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europae* L.). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 60, n. 4, p. 302-306, 2017.

MELO, L. C.; OLIVEIRA, C. V.; MANFREDI, C.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Efeito de bactérias na promoção do enraizamento em clone de eucalipto. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15; p. 736-747, 2012.

MIRANDA, L. **Efeito de fitorreguladores e rizobactérias promotoras de crescimento na produção de mudas clonais de *Pinus taeda***. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO-PR), 2015, 59 p.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOTERLE, L. M.; SANTOS, R. F.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; BONATO, C. M.; CONRADO, T. Efeito de biorregulador na germinação e no vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 5, p. 651-660, 2011.

NETO, D. D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JÚNIOR, P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; BONNECARRÉRE, R. A. G.; CRESPO, P. E. N. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da FZVA. Uruguiana**, v. 11, n. 1, p. 1-9. 2004.

NETO, S. P. M.; DUBOC, E. Parâmetros genéticos da densidade básica da madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 213**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Planaltina, Distrito Federal, 2008.

OLIVEIRA, M. L. **Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus* spp.** Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, 2003, 64 p.

OLIVEIRA, L. S. **Enxertia, microenxertia e descrição do tropismo em *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE.** Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, 2010, 90 p.

OLIVEIRA, L. F. **Micropropagação de *Pinus taeda* L. a partir de material juvenil.** Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, 2011, 108 p.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 487-508, 2017.

PANIGRAHI, S.; MOHANTY, S.; RATH, C. C. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with indole acetic acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. **South African Journal of Botany**, v. 7, n. 25, 2019.

PEREIRA, F. B.; PERES, F. S. B. Nutrição e enraizamento adventício de plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, n. 87, p. 319-326, 2016.

PIMENTA, A. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; OLIVEIRA, B. H. de; CARPANEZZI, A. A.; KOEHLER, H. S. Interações entre reguladores vegetais, épocas do ano e tipos de substrato no enraizamento de estacas caulinares de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. (Pau-de-leite). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 50, p. 53-67, 2005.

PINTO JÚNIOR, J. E.; SANTOS, P. E. T.; AGUIAR, A. V.; KALIL FILHO, A. N.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V.; SOUSA, V. A. Melhoramento genético de espécies arbóreas na Embrapa Florestas: uma visão histórica. **Documentos 259**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Colombo, Paraná, 2013.

PRADO, D. Z. **Enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* pela ação de peróxido de hidrogênio, quercetina e ácido indolbutírico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014, 113 p.

QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria, 2009, 69 p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHOR, S.E. **Biologia Vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.

RIBEIRO, A. S.; PAMPHILE, J. A. Microrganismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista UNINGÁ Review**, vol. 29, n. 3, p. 88-93, 2017.

RIOV, J., YANG, S.F. Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 8, p. 131-141, 1989.

RIVERA-RODRÍGUEZ, M.; VARGAS-HERNÁNDEZ, J. J.; LÓPEZ-UPTON, J.; VILLEGAS-MONTER, Á.; JIMÉNEZ-CASAS, M. Enraizamiento de estacas de *Pinus patula*. rooting of *Pinus patula* cuttings. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 39, n. 4, p. 385 - 392, 2016.

SAKIYAMA, C. C. H. **Colonização de *Coffee arabica* L. Por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2001, 80 p.

SANTANA, O. A.; IMAÑA-ENCINAS, J. Influência do vento no volume de toras e no fator de forma de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 2, p. 347-356, 2013.

SANTOS, A. P.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L.; REIS, G. G. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, n. 68, p. 29-38, 2005.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SANTOS, K. G. **Efeito da adubação foliar e condicionadores de solo no enraizamento, crescimento e rustificação de mudas clonais de *Pinus* sp.** Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, 2015, 127 p.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SHIMIZU, J. Y. Pínus na silvicultura brasileira. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Embrapa Florestas, 2008, 223 p.

SILVEIRA, É. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária), Universidade Estadual Paulista, 2008, 99 p.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, v. 31, p. 425-448, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**. 6. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017, 858 p.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, 2001, 77 p.

TITON, M.; XAVIER, A.; REIS, G. G.; OTONI, W. C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 619-625, 2003.

TRIANOSKI, R. **Avaliação da qualidade da madeira de espécies de pinus tropicais por meio de métodos convencionais e não destrutivo**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, 2012, 554 p.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 229-235, 2006.

VAZ, L. A. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* como promotoras de crescimento vegetal e no controle de pragas em diferentes culturas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, 2014, 107 p.

VEGA-CELEDÓN, P.; MARTÍNEZ, H.C.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. Biosíntesis de ácido indol-2-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. **Cultivos Tropicales**, v. 37, n. especial, p. 33-39, 2016.

VIEIRA, R. S. **Aplicação de rizobactérias e bactérias endofíticas para promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012, 64 p.

WENDLING, I. Propagação Vegetativa. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. I Semana do Estudante Universitário, Florestas e Meio Ambiente, 2003.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. **Documentos 130**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Colombo, Paraná, 2006.

ZANCHETTA, D.; PINHEIRO, L. S. Análise biofísica dos processos envolvidos na invasão biológica de sementes de *Pinus elliottii* na estação ecológica de Itirapina – SP e alternativas de manejo. **Revista Climatologia e Estudos de Paisagem**, Rio Claro, v. 2, n. 1, 2007.

## ANEXOS

**ANEXO 1 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A SÍNTESE DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA) PELAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE TECIDOS VEGETAIS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. *Azospirillum brasilense* 2083 E *Azospirillum brasilense* 2084 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO (100 mg L<sup>-1</sup>). Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	Concentração de IAA (µg mL <sup>-1</sup> )		
	Quadrados Médios		
	GL	Presença de Triptofano	Ausência de Triptofano
Tratamentos	38	0,065**	0,328**
Resíduo	78	0,034	0,126
Total	116		
Média		0,069	0,093
CV (%)		30,18	43,08
Coefficiente de Bartlett (χ <sup>2</sup> )		94,03**	101,66**

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.

**ANEXO 2 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* 2083, *Azospirillum brasilense* 2084 E TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
Tratamentos	3	3565,44**	3766,64**	47,76*	1884,19**	38,82**
Resíduos	16	165,20	73,60	72,00	54,27	2,18
Total	19					
Média		28,88	9,48	1,64	16,10	2,63
CV (%)		9,95	20,24	115,69	10,23	12,53
Coefficiente de Bartlett (χ <sup>2</sup> )		1,35 <sup>ns</sup>	3,61 <sup>ns</sup>	7,24 <sup>ns</sup>	16,33 <sup>ns</sup>	10,50 <sup>ns</sup>

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.



**ANEXO 3 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM 38 ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
<b>Tratamentos</b>	38	74,58 <sup>ns</sup>	62,09 <sup>ns</sup>	6,90 <sup>ns</sup>	130,96**	1,96 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>	117	261,75	232,50	20,25	570,68	7,39
<b>Total</b>	155					
<b>Média</b>		7,67	2,22	0,11	10,53	0,94
<b>CV (%)</b>		19,49	63,56	381,76	20,97	26,88
<b>Coefficiente de Bartlett (<math>\chi^2</math>)</b>		39,02 <sup>ns</sup>	42,05 <sup>ns</sup>	2,71 <sup>ns</sup>	45,83 <sup>ns</sup>	61,65**

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.

**ANEXO 4 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES GERMINADAS (%GER), SEMENTES NÃO GERMINADAS (%NGER), SEMENTES COM GERMINAÇÃO INCOMPLETA (%GERINC), TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG) E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Pinus taeda* L. INOCULADAS COM 11 ESTIRPES SELECIONADAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	%GER	%NGER	%GERINC	TMG	IVG
<b>Tratamentos</b>	11	10,73 <sup>ns</sup>	12,67 <sup>ns</sup>	2,23**	12,91 <sup>ns</sup>	0,38 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>	36	26,25	44,00	47,75	33,59	0,76
<b>Total</b>	47					
<b>Média</b>		8,98	1,67	1,15	12,67	0,83
<b>CV (%)</b>		9,51	66,33	100,51	7,62	17,52
<b>Coefficiente de Bartlett (<math>\chi^2</math>)</b>		7,04 <sup>ns</sup>	8,01 <sup>ns</sup>	0,74 <sup>ns</sup>	16,48 <sup>ns</sup>	35,23 <sup>ns</sup>

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.

**ANEXO 5 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM DUAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* E TRÊS CONCETRAÇÕES DE IBA. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	ME	NR	CM	MC	MV	MM	MMA	MB
<b>Tratamentos</b>	6	12,36 <sup>ns</sup>	15,86 <sup>ns</sup>	189,06 <sup>ns</sup>	92,93 <sup>ns</sup>	41,50 <sup>ns</sup>	27,86 <sup>ns</sup>	152,86 <sup>**</sup>	33,93 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>	21	57,75	83,00	470,80	179,50	203,75	78,00	68,00	87,50
<b>Total</b>	27								
<b>Média</b>		2,18	2,43	7,34	10,64	4,25	2,93	5,43	5,14
<b>CV (%)</b>		76,12	81,86	64,50	27,47	73,29	65,81	33,15	39,69
<b>Coeficiente de Bartlett (<math>\chi^2</math>)</b>		6,18 <sup>ns</sup>	4,64 <sup>ns</sup>	4,53 <sup>ns</sup>	13,21 <sup>ns</sup>	1,77 <sup>ns</sup>	8,85 <sup>ns</sup>	4,14 <sup>ns</sup>	2,20 <sup>ns</sup>

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.

**ANEXO 6 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MINIESTACAS ENRAIZADAS (%ME), NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES/MINIESTACA (CM), MINIESTACAS COM CALOS (%MC), MINIESTACAS VIVAS (%MV), MINIESTACAS MORTAS (%MM), MINIESTACAS QUE MANTIVERAM AS ACÍCULAS INICIAIS (%MMA) E MINIESTACAS COM BROTAÇÕES (%MB) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	ME	NR	CM	MC	MV	MM	MMA	MB
<b>Tratamentos</b>	27	12,74 <sup>ns</sup>	62,67 <sup>ns</sup>	857,99 <sup>ns</sup>	62,18 <sup>**</sup>	101,53 <sup>**</sup>	46,96 <sup>ns</sup>	68,86 <sup>**</sup>	65,86 <sup>**</sup>
<b>Resíduos</b>	84	43,75	300,25	2645,30	75,50	126,75	91,00	67,00	72,00
<b>Total</b>	111								
<b>Média</b>		0,62	1,40	4,04	2,20	3,92	3,27	4,54	2,96
<b>CV (%)</b>		117,14	134,87	138,81	43,16	31,34	31,85	19,69	31,23
<b>Coeficiente de Bartlett (<math>\chi^2</math>)</b>		6,14 <sup>ns</sup>	31,49 <sup>ns</sup>	73,98 <sup>ns</sup>	24,89 <sup>ns</sup>	56,78 <sup>ns</sup>	21,61 <sup>ns</sup>	34,89 <sup>ns</sup>	20,55 <sup>ns</sup>

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.

**ANEXO 7 –** RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PORCENTAGEM DE MICROESTACAS ENRAIZADAS (%MIE), MICROESTACAS VIVAS (%MIV) E MORTAS (%MIM), MICROESTACAS CONTAMINADAS (%MIC), NÚMERO DE BROTOS POR MICROESTACA (NBMI) E ALTURA MÉDIA DAS MICROESTACAS (ALMI) SUBMETIDAS A INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*. Curitiba, PR, abril de 2021.

Fontes de Variação	GL	%MIE	%MIV	%MIM	%MIC	NBMI	ALMI
Tratamentos	11	0,00 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	3,10 <sup>**</sup>	129,13 <sup>**</sup>	84,44 <sup>**</sup>
Resíduos	228	240,00	10,05	10,05	8,30	565,80	719,49
Total	239						
Média		0,00	0,95	0,05	0,95	1,93	5,18
CV (%)		0,00	22,00	458,07	20,08	81,48	34,31
Coefficiente de Bartlett ( $\chi^2$ )		0,00 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	1,96 <sup>ns</sup>	16,10 <sup>ns</sup>	46,31 <sup>ns</sup>

Fonte: Baldin (2021). \* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade. GL = Graus de Liberdade e CV (%) = Coeficiente de Variação Experimental.