

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
AGRONOMIA**

**PROPAGAÇÃO DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense*
Cambess) POR MINIESTACAS INOCULADAS COM
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS**

Autor: Luiz Carlos Ramos dos Santos
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

RIO VERDE – GO
Março – 2013

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
AGRONOMIA**

**PROPAGAÇÃO DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense*
Cambess) POR MINIESTACAS INOCULADAS COM
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS**

Autor: Luiz Carlos Ramos dos Santos
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de Concentração Ciências Agrárias.

RIO VERDE – GO
Março – 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
elaborada por Igor Yure Ramos Matos CRB 1 – 2819.**

S236p Santos, Luiz Carlos Ramos dos.

Propagação de Guanandi (*Colophyllum Brasiliense* Cabess) por miniestacas inoculados com microrganismos rizosféricos / Luiz Carlos Ramos dos Santos. - 2013.

63 f.: il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano, Campus de Rio Verde, 2013.

1. Fósforo. 2. Auxina. 3. Solubilização de fosfatos. 4. Emergência. 5. Miniestaquia. 6. Substrato. 7. Mudas. 8. *Colophyllum Brasiliense* Cabees. I. título. II. Autor. III. Assunto.

CDU: 631.461:582.28

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
AGRONOMIA**

**PROPAGAÇÃO DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense*
Cambess) POR MINIESTACAS INOCULADAS COM
MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS**

Autor: Luiz Carlos Ramos dos Santos
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Agronomia, Área de
concentração: Ciências Agrárias

APROVADA em 28 de março de 2013.

Prof. Dr. João das Graças Santana
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares
Avaliador externo
UFMT – Cuiabá

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

DEDICO ESTE TRABALHO:

A minha Família, que sempre esteve ao meu lado dando força, carinho, solidariedade e, sobretudo, pelo amor incondicional. Aos mestres que souberam ensinar e guiar na direção correta para que esse crescimento seja possível e, que continuem indeterminadamente. Àqueles que nos inspiram e fazem sempre querer prosseguir e melhorar.

AGRADECIMENTOS

São muitos aqueles a quem devo agradecer pelo sucesso desse empreendimento. Em primeiro lugar a Deus, por me dar a inspiração e os meios necessários para a realização de meus sonhos e poder, assim, vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais José Sebastião dos Santos e Maria Conceição Ramos (*in memoriam*) e ao meu filho Marcel Pereira Ramos (*in memoriam*), e toda a minha família Lilian Aparecida Martins Soares Ramos (esposa), Maria Vitória Martins Soares Ramos (filha) e Luís Felipe Martins Soares Ramos (filho), que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e por ter me incentivado nas minhas decisões procurando me estimular tomando para ela, nos momentos mais difíceis, toda minha ansiedade e preocupação.

Ao Professor Dr. Edson Luiz Souchie, meu orientador e amigo, meu agradecimento todo especial, por seu profissionalismo, paciência e pela oportunidade de me deixar compartilhar de seus conhecimentos. Também aos Professores Dr. Alan Carlos Costa e Marcos Antônio Soares, meu apreço, pela orientação, dedicação, amizade e pelas sugestões feitas para enriquecimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) do IF Goiano – Campus Rio Verde e, especialmente, ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal da instituição, pela confiança e

oportunidades concedidas para minha formação, convivência respeitosa e contribuição profissional.

Em especial à doutoranda em Ciências Agrárias - Agronomia e Mestre em Ciências do Solo Isabel Cristina M. C. Jakoby “Bel” por ter me ajudado muito durante todo o mestrado. Desde o primeiro dia em que comecei a trabalhar no Laboratório de Microbiologia Agrícola, vulgo “Toca dos Gatos”, senti que faria grandes amizades ali dentro. E não deu outra (Cíntia, Colemar, Liliane, Maíra, Maria Gabriela, Paula, Ricardo, Moacir, Rodrigo e Thaís). Hoje, agradeço muito o esforço de todos para me ajudar a concluir esta etapa. Esse trabalho sem o apoio e ajuda de vocês não seria nada.

À Mestranda Fábria Barbosa da Silva, pela força, incentivo, amizade e ajuda em nossas avaliações, no Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal.

À minha sobrinha Yasmin Giovanna dos Santos Carvalho, aluna de Iniciação Científica do IF Goiano – Campus Rio Verde, que me ajudou em todas as etapas do último experimento.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do IF Goiano – Campus Rio Verde, pelo apoio, momentos difíceis e divertidos que passamos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Luiz Carlos Ramos dos Santos, natural de Rio Verde – GO, filho de José Sebastião dos Santos e Maria Conceição Ramos. Sua formação profissional iniciou em 1995, no curso de Ciências – Habilitação em Biologia – Licenciatura Plena pela Universidade de Rio Verde - FESURV. Em 2001, *Lato Sensu* em Orientação Educacional – Universidade Salgado de Oliveira – UNIVERSO. Em 2003, *Lato sensu* em Biologia Aplicada a Saúde pela Universidade de Rio Verde- FESURV. Em 2005, *Lato sensu* em Capacitação para Professor do Ensino Médio em Ciências da Natureza – Química pela Universidade de Brasília – UnB. Em 2009, cursou *Lato sensu* para Especialista em Educação Profissional Integrada à Educação Básica na Modalidade de Educação de Jovens e Adultos pelo IF Goiano - Campus Rio Verde. Em 2011, iniciou seu *Stricto sensu* - Mestrado em Ciências Agrárias – Agronomia no IF Goiano – Campus Rio Verde, concluindo-o em março de 2013.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
BIOGRAFIA	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
A espécie <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	1
Descrição morfológica e fenologia	2
Microrganismos rizosféricos e a promoção do crescimento vegetal	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO I	12
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E SINTETIZADORES DE AIA, DA RIZOSFERA DE GUANANDI	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	18
Obtenção de raízes de guanandi	18
Isolamento de microrganismos rizosféricos	20
Avaliação da produção de AIA por microrganismos rizosféricos de guanandi	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II	28
PROPAGAÇÃO CLONAL DE GUANANDI, INOCULADO COM MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E PRODUTORES DE ÁCIDO INDOLACÉTICO	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
INTRODUÇÃO	31
OBJETIVO GERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MATERIAL E MÉTODOS	35
Origem das Sementes	35
Escolha das Sementes	36
Avaliação do sistema radicular	38
Análise estatística	39

RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Experimento de emergência de sementes	39
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Introdução Geral - Descrição morfológica e fenológica

Figura 1. Folhas de guanandi (<i>C. brasiliense</i>) (Rocha, M. F. 09/08/2007)	03
Figura 2. Frutos (A) (Rocha, M. F. 30/06/2012) e sementes de guanandi (<i>C. brasiliense</i>) (B) (Aquino, W. M. 04/11/2012).....	04
Figura 3. Exemplar de árvore de guanandi (<i>C. brasiliense</i>) (Rocha, M. F. 26/01/2003).....	05

Capítulo I - Isolamento e seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos e sintetizadores de AIA, da rizosfera de guanandi

Figura 1. IF Goiano – Campus Rio Verde (A) e Reserva da Fazenda São Tomaz Olho D’água (B), em Rio Verde, GO.....	19
Figura 2. Muda de guanandi sendo retirada do solo.....	19

Capítulo II – Propagação clonal de guanandi, inoculado com microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de ácido indolacético

Figura 1. Casa de vegetação do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal	35
Figura 2. Sementes de guanandi (A) e substrato Bioplant [®] (B)	36
Figura 3. Disposição das sementes de guanandi nos substratos Bioplant [®] (A) e areia (B)	36
Figura 4. Mudas de guanandi, originárias de sementes, aos 85 dias após semeadura em substrato areia (A) e Bioplant [®] (B)	37

Figura 5. Miniestacas de guanandi cultivadas em substrato Bioplant [®] e inoculadas com MSF e sintetizadores de AIA	38
Figura 6. Sementes de guanandi germinadas aos 17, 30, 60 e 85 dias após a semeadura, nos substratos areia e Bioplant [®]	39
Figura 7. Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (B), Taxa transpiratória (C) e <i>Ci/Ca</i> (D), em miniestacas de guanandi, aos 45 dias após o plantio em substrato Bioplant [®] , inoculado com bactérias (BSF), fungos solubilizadores de fosfatos (FSF) e produtores de AIA e <i>Trichoderma</i> (T). Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)	41

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I - Isolamento e seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos e sintetizadores de AIA, da rizosfera de guanandi

- Tabela 1.** População rizosférica de bactérias (BSF) e fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e não solubilizadores, isolados de guanandi, procedente do campo e de viveiro, em Rio Verde, GO..... 21
- Tabela 2.** Teores de P (mg P mL^{-1}) e ácido indolacético ($\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) detectados em meio líquido, adicionado de FePO_4 , e incubado com bactérias (BSF) e fungos solubilizadores de P (FSF) rizosféricos de guanandi 22

Capítulo II – Propagação clonal de guanandi, inoculado com microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de ácido indolacético

- Quadro 1.** Custo e retorno financeiro de 01 ha de guanandi 33
- Quadro 1.** Quadro comparativo de rentabilidade do guanandi com outras culturas 33
- Tabela 1.** Clorofila A, B e total e razão F_v/F_m d mudas de guanandi, originárias de miniestacas, inoculadas com bactérias (BSF), fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e *Trichoderma* (T) e cultivadas em substrato e Bioplant[®] 40
- Tabela 2.** Avaliações do sistema radicular de plantas de guanandi, originárias de miniestacas, inoculadas com bactérias (BSF), fungos

solubilizadores de fosfato (FSF) e <i>Trichoderma</i> (T) e cultivadas em substrato e Bioplant [®]	42
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

AIA: Ácido Indolacético
BDA: Ágar Dextrose Batata
BSF: Bactéria Solubilizadora de Fosfato
DO: Densidade Óptica
FMA: Fungos Micorrízicos Arbusculares
g: Grama
GELP: Glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de solo e sais de base
h: Hora
ha: Hectare
IS: Índice de Solubilização
mg: Miligrama
mL: Mililitros
M: Milimolar
MSF: Microrganismos Solubilizadores de Fosfato
µg: Micrograma
µL: Microlitro
µm: Micrômetro
µM: Micromol
nd: Não Detectado
nm: Nanômetro
PGPR: Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal
rpm: Rotações por Minuto
SISVAR: Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos
TC: Taxa de Colonização
UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso
v/v: Volume por Volume

RESUMO

A solubilização de fosfatos por microrganismos é um importante processo para a disponibilização de fósforo (P) às plantas. O guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente desde a América Central até a América do Sul. No Brasil, tem alto valor econômico pela ampla utilização para os mais diversos fins, tais como construção civil, marcenaria e construção naval. Estudos sobre sua multiplicação em viveiro possibilitam produções homogêneas em plantios de escalas comerciais, além de favorecer a manutenção de seu germoplasma. Com este trabalho, objetivou-se: a) isolar, em meio sólido, microrganismos solubilizadores e não solubilizadores de CaHPO_4 , a partir da rizosfera de guanandi coletado em viveiro e campo; b) quantificar, em meio líquido, a capacidade de solubilização de FePO_4 , por isolados rizosféricos de guanandi solubilizadores de CaHPO_4 ; c) quantificar a produção de AIA por microrganismos rizosféricos solubilizadores de FePO_4 , para inocular e maximizar a formação de miniestacas de guanandi; d) avaliar a influência dos substratos areia e Bioplant[®] na emergência de sementes de guanandi, em casa_-de_-vegetação; e) verificar a viabilidade do processo de propagação clonal para o guanandi; f) avaliar o desenvolvimento de miniestacas de guanandi, após a inoculação de MSF e produtores de AIA. Duas plantas de guanandi, uma cultivada em viveiro e outra em campo foram utilizadas para o isolamento de bactérias e fungos solubilizadores de CaHPO_4 e FePO_4 . A miniestaquia se mostrou eficiente estratégia para a propagação de guanandi, podendo ser indicada em programa de silvicultura clonal para fins comerciais, já que a taxa de estabelecimento das miniestacas é alta e a fisiologia das mudas, quanto ao processo fotossintético, não é afetado negativamente. A inoculação do isolado bacteriano BSF 34 maximizou as variáveis fotossintéticas avaliadas, além da biomassa seca radicular de miniestacas de guanandi.

Palavras-chave: fósforo, auxina, solubilização de fosfatos, emergência, miniestaquia, substrato, mudas, *Calophyllum brasiliense* Cambess.

GENERAL ABSTRACT

The phosphate solubilization by microorganisms is an important process for the provision of matches to plants. This study aimed to: a) isolating, in solid, solubilizing microorganisms and non-solubilizing CaHPO_4 from the rhizosphere of guanandi collected in nursery and field, b) quantify, in liquid medium, the solubilization ability FePO_4 by isolated rhizosphere of guanandi solubilizing CaHPO_4 c) quantify the production of IAA by rhizosphere microorganisms solubilizing FePO_4 , to inoculate and maximize training minicuttings guanandi. Guanandi two plants, one grown under nursery and another field were used for isolation of bacteria and fungi solubilizing FePO_4 and CaHPO_4 . Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) is a naturally occurring tree species from Central America to South America in Brazil, has high economic value due to its extensive use for various purposes, such as construction, carpentry and construction shipbuilding. Studies on their multiplication in nurseries enable homogeneous productions in scale commercial plantations, besides favoring the maintenance of their germplasm. This work aimed to: a) evaluate the influence of substrates and sand Bioplant[®] in emergency seed guanandi in a green house, b) verify the feasibility of the process of clonal propagation for guanandi c) evaluate developing minicuttings guanandi after inoculation and MSF producers AIA. The minicutting proved to be an efficient strategy for propagating guanandi and may be indicated in clonal forestry program for commercial purposes, since the rate of establishment of the shoots is high and physiology of seedlings, as the photosynthetic process is not adversely affected. Inoculation of bacterial isolate BSF34 maximized photosynthetic variables evaluated, besides the dry biomass of root cuttings of guanandi.

Keywords: phosphorus, auxin, phosphate solubilization, emergency minicutting, substrate, seedlings, *Calophyllum brasiliense* Cambess.

INTRODUÇÃO

A escassez de informações sobre espécies nativas favorece o uso de espécies exóticas em reflorestamento (Butterfield e Fisher, 1994). Porém, espécies nativas com potencial para produção de madeiras usadas em serraria, são catalogadas e figuram como alternativa atraente para a produção florestal (Piotto et al., 2003a).

No ano 2000, a totalidade das plantações florestais comerciais estabelecidas no Brasil, era composta apenas pelo gênero *Eucalyptus* (79,4%) e *Pinus* (20,6%) (Kronka et al., 2003). No entanto, nos últimos anos, em outros países, ocorreu mudança de perspectiva na seleção de espécies e até para plantações industriais já existem exemplos de espécies nativas promissoras (Piotto et al., 2003b). Além da elevada produtividade de algumas espécies nativas e do alto valor comercial da madeira, muitos pesquisadores enfatizam os benefícios ambientais, associados ao estabelecimento das plantações florestais. Tais benefícios são capazes de incrementar o valor da plantação, uma vez que, espécies nativas são mais adequadas para o hábitat da vida silvestre (Piotto et al., 2005).

Entre as espécies nativas pesquisadas nas últimas décadas, está o guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). Essa espécie de ampla distribuição tropical é plantada comercialmente em diversos países da América Latina, em virtude dos bons resultados de crescimento (Silva et al., 2010; Piotto et al., 2003a; Piotto et al., 2003b). O sudeste brasileiro, onde predominava a Mata Atlântica, é o maior polo consumidor das madeiras nativas em toras do Brasil, provenientes da Floresta Amazônica. Com a crescente taxa de desmatamento das florestas nativas e a consequente diminuição da oferta dos produtos florestais, surgiu o interesse de estabelecer plantações com espécies nativas de alto valor comercial, para suprir a demanda presente e futura de madeiras nobres (Piotto, 2005).

A espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess

Etimologia: *Calophyllum*, folha bonita; *brasiliense*, do Brasil. O nome comum guanandi é proveniente da língua tupi gwanã'di, significando que é grudento. De acordo com o sistema de classificação de Cronquist, a taxonomia de *C. brasiliense* obedece à seguinte hierarquia:

Divisão: *Magnoliophyta (Angiospermae)*

Classe: *Magnoliopsida (Dicotyledonae)*

Ordem: *Theales*

Família: *Clusiaceae (Guttiferae)*

Espécie: *Calophyllum brasiliense Cambessèdes*

Sinonímia Botânica: *Calophyllum antillanum Brit. Standl.*; *Calophyllum ellipticum Rusby*; *Calophyllum rekoi Standl.*

Descrição morfológica e fenologia

Árvore de 20 a 45m de altura de acordo com a região e condições climáticas e, com até 180 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), copa redonda, folhagem verde escura, com galhos obliquamente ascendentes, fuste reto, cilíndrico, base cônica ou alargada sem raízes tabulares. A casca é cinzenta, áspera, dura e com estreitas fissuras longitudinais. As folhas são simples, inteiras, opostas, oblongo-lanceoladas de 5 a 18 cm de comprimento e 2,5 a 5 cm de largura, ápice acuminado, base cuneiforme a obtusa, glebas com pecíolos de 1 a 2,5cm de comprimento (Piotto, 2005).

O guanandi possui tronco ereto e cilíndrico e a copa é piramidal a ovoide. A casca de coloração parda é dura, amarga e aromática. As folhas são pecioladas, simples, oblongas, elípticas, brilhantes em ambas as faces, sem cera, coriáceas, glabras. As nervuras laterais são numerosas, paralelas, muito próximas entre si e proeminentes em ambas as faces (Figura 1).

O guanandi apresenta ampla distribuição natural nas Américas, desde o México através da América Central e Antilhas, até a América do Sul. Encontra-se desde o nível do mar até 1500m de altitude, em locais com precipitação entre 1400 a 3500 mm e temperatura entre 20 a 28 °C. Cresce bem em solos aluviais, argilosos, úmidos até saturados por água e ácidos (pH 4,5 a 6,0). Na América Central, é encontrado em solos ricos em ferro (Fe) e alumínio (Al) e pobres em potássio (K) e P (Piotto, 2005).

As inflorescências são racemosas ou compostas de ramos curtos, com 2-10 flores axilares e pedicelo de 5-10 mm. As flores têm pétalas reflexas de coloração creme-amarelada, aromáticas com estames numerosos nas flores masculinas e poucos nas hermafroditas. Os frutos são globosos, ovoides ou elipsoides, sendo classificados como drupa (Marques e Joly, 2000), com 2,5 a 3 cm de diâmetro. O epicarpo coriáceo apresenta coloração verde e cada fruto contém geralmente uma semente (Figura 2A e B). A frutificação ocorre de fevereiro a setembro (Marques e Joly, 2000).

A madeira é dura, pesada a moderadamente pesada, com peso específico de 0,45 a 0,60g/cm³, peso verde de 761 a 950 kg/m³, tem excelentes características e é amplamente utilizada. Apresenta grã entrecruzada, textura média e alta durabilidade natural. A madeira apresenta ótimas características físicas e mecânicas e é fácil de secar (Piotto, 2005). O guanandi é utilizado para fabricação de móveis finos, pisos, mastros de embarcações e carpintaria em geral. O látex extraído do tronco tem aplicações medicinais (Piotto, 2005). No Brasil essa espécie tem alto valor econômico por causa da larga utilização para os mais diversos fins, tais como construção civil, marcenaria, construção naval (Xavier et al., 2009).

Esta é uma espécie considerada clímax por demonstrar regeneração abundante na sombra. O valor de sua madeira é conhecido por ser resistente à água, ter boa durabilidade e ter características semelhantes ao mogno (Carvalho, 2008). Segundo esse mesmo autor, está na lista de espécies florestais tropicais que devem ser consideradas em programas de conservação de recursos genéticos “*in situ*” e “*ex situ*”, (2008).

No Brasil, o guanandi tem alto valor econômico por sua larga utilização para os mais diversos fins, tais como construção civil, marcenaria, construção naval, podendo, com sua biomassa, contribuir para melhorar a fertilidade do solo em sistemas silvipastoris (Melotto et al., 2009) e uso em fitoterapia (Júnior et al., 2005; Noldin et al., 2006). É de fundamental importância estabelecer ações que se mostrem eficientes para a propagação desta espécie (Silva et al., 2010). O guanandi possui vantagens sobre outras espécies pela capacidade de se desenvolver em locais com saturação hídrica, sendo frequentemente encontrado em ambientes em que o solo é permanentemente ou periodicamente inundado e, locais com menor diversidade de espécies em relação às florestas com outros tipos de solo (Reis et al., 2009).



Figura 1. Folhas de guanandi (*C. brasiliense*) (Rocha, M. F. 09/08/2007).



Figura 2. Frutos (A) (Rocha, M. F. 30/06/2007) e sementes de guanandi (*C. brasiliense*) (B) (Aquino, W. M. 04/11/2012).

As flores podem ser encontradas durante todo o ano, contudo, a floração está mais concentrada nos meses de junho e julho. Variações no padrão de floração são encontradas ao longo de sua distribuição geográfica. Flores unissexuais ou hermafroditas podem ser encontradas numa mesma árvore. A dispersão é realizada principalmente por morcegos do gênero *Artibeus* (Mello et al., 2005), enquanto roedores e pássaros são considerados secundários. A água também pode contribuir para a dispersão dos frutos de guanandi.

Ampla distribuição no Brasil, a madeira do guanandi é utilizada desde o século XVII para a construção naval, em virtude da durabilidade e resistência à água. Foi explorado predatoriamente pelos brasileiros, até sua quase extinção. Pela sua importância na construção naval, em 1810, o governo Imperial reservou para o Estado, o monopólio de exploração da sua madeira, sendo, portanto, historicamente a primeira Madeira de Lei do Brasil (Lorenzi, 1992). Atualmente, é uma das espécies florestais de maior interesse pela gama de produtos que podem ser produzidos a partir da sua madeira. A árvore é bastante ornamental, podendo ser inclusive empregada no paisagismo em geral. Estas árvores têm altura variando de 40 a 45 m e DAP máximo de 1,80 m (Figura 3).



Figura 3. Exemplo de árvore adulta de guanandi (*C. brasiliense*) (Rocha. M. F. 26/01/2003).

O guanandi possui importância medicinal. O chá de suas cascas obtido por infusão e é popularmente utilizado para tratamento de reumatismo, hemorroidas e úlceras crônicas (Carvalho, 2008). Também é empregado na cura de enfermidades cutâneas e usado como aromatizante natural (semelhante ao sândalo). Estudos fitoquímicos possibilitaram o isolamento de um calanolídeo a partir de espécies de guanandi, e foi observado que pode funcionar como uma das substâncias químicas mais ativas frente ao vírus HIV-1 (Ito et al., 2003). Silva et al. (2001) realizaram estudos com guanandi e observaram a presença de diversas substâncias químicas, tais como xantonas, sitosterol e triterpenos no caule e na resina. Algumas cumarinas, isoladas dessa espécie, apresentaram atividade anticancerígena e antimicrobiana (Ito et al., 2003).

Apesar da sua possível utilização medicinal, a exploração do guanandi é atualmente voltada para a construção de mastros de navios, embarcações, pisos, portas e móveis. A qualidade da madeira é similar às espécies como o *Eucalyptus* spp. e o *Pinus* spp. O guanandi apresenta valor comercial 100 vezes maior quando comparado aos reflorestamentos de eucalipto (Piotto, 2005). O guanandi é citado por especialistas como uma espécie promissora em substituição ao mogno, que atualmente possui corte proibido no Brasil (Piotto, 2005) e o preço médio de venda é de R\$ 2.000,00/m³. Estimativas preveem uma valorização de, no mínimo, 6% ao ano desse produto. Como se trata de uma espécie pioneira, também é bastante requisitada para reflorestamento de

áreas degradadas. Outro fator que contribui para essa característica é a utilização do fruto pela fauna (Piotto, 2005).

Marques e Joly (2000) avaliaram a germinação e crescimento de guanandi e constataram que os frutos são dispersos por morcegos e pela água no período mais chuvoso. Apesar da semente não germinar, ela se mantém viável, pelo menos por três meses, submersa ou enterrada no solo encharcado. Ao encontrar microsítios favoráveis, por exemplo, quando ocorre a redução do nível da água, a semente germina. Scarano et al. (1997) observaram o mesmo resultado. Nesse trabalho, o pericarpo de algumas sementes foi removido e de outras não. Foi testada a capacidade germinativa dessas sementes e observou-se que, após duas semanas, 60% das sementes que não tinham o pericarpo e, apenas 18% das sementes estavam intactas, germinaram.

De acordo com Scarano et al. (1997), num estudo comparativo com outras duas espécies da família *Clusiaceae*: *Tovomitopsis paniculata* (Spreng.) e *Symphonia globulifera* L., o guanandi não apresenta estruturas morfológicas comuns de plantas adaptadas a locais inundados, tais como lenticelas hipertróficas e raízes adventícias, que poderiam permitir um aumento na difusão de oxigênio da parte aérea para o sistema radicular. No entanto, o guanandi possui outras características adaptativas que permitem a colonização em locais inundados, como sementes capazes de boiar, capacidade de dispersão e tolerância à anoxia. Envolve também uma série de qualidades que aperfeiçoam o estabelecimento e sobrevivência nesses ambientes, como dormência das sementes e dispersão dos frutos pela água e principalmente por morcegos.

Microrganismos rizosféricos e a promoção do crescimento vegetal

Os microrganismos mais comumente estudados como agentes de controle biológico de doenças em plantas e apresentam também atividade como promotores de crescimento vegetal, são os fungos do gênero *Trichoderma* spp. (Gravel et al., 2007; Santos et al., 2010; Machado et al., 2011). Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos do solo podem ser diretos e indiretos. Os diretos podem ser a produção de fitormônios ou outra substância análoga, que influenciam no crescimento ou desenvolvimento da planta (Machado et al., 2011). Também, de forma direta, algumas espécies deste gênero podem suprir as necessidades nutricionais do vegetal pela solubilização de fosfatos (Gravel et al., 2007). Já os benefícios indiretos podem ser

pela ação de microrganismos por meio da supressão de patógenos (Harman et al., 2004; Silva et al., 2011; Gava e Menezes, 2012).

Quanto à produção de fitormônios, a síntese de auxinas, particularmente o ácido indolacético (AIA) promove o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, que podem melhorar a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal (Caballero-Mellado et al., 2006). Vários estudos têm reportado que os microrganismos estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas, tanto em meio de cultura quanto no solo (Souchie et al., 2007; Carvalho Filho, 2008). O aminoácido L-triptofano é usado como precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e microrganismos (Khalid et al., 2004). Os exsudados radiculares são fontes naturais de L-triptofano (Lum e Hirsch, 2003) para a microbiota do solo, contribuindo para a síntese microbiana de AIA na rizosfera. A produção de AIA por fungos na rizosfera pode proporcionar o desenvolvimento radicular, como observado por Bjorkman (2004), Gravel et al. (2007), Souchie et al. (2007) e Carvalho Filho (2008). Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, diversas bactérias e fungos rizosféricos solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos e demonstram potencial para promover o desenvolvimento vegetal, sendo relatados como solubilizadores de fosfatos em diversos trabalhos (Souchie et al., 2005; Vassilev et al., 2006; Barroso e Nahas, 2008; Kapri e Tewari, 2010). Kapri e Tewari (2010) destacaram o potencial de solubilização de fosfatos por isolados de *Trichoderma* sp. em meio de cultura e o aumento significativo nos parâmetros de crescimento de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) em ensaios de casa de vegetação. Já Vassilev et al. (2006) relataram alta eficiência na solubilização de fosfato natural por *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium*.

A utilização de microrganismos que possuem a capacidade de realizar este tipo de solubilização é empregada como forma de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, visando ao melhor aproveitamento de fosfatos naturais (Silva Filho et al., 2002). Portanto, maior compreensão da eficiência e capacidade de *Trichoderma* em solubilizar fosfatos e sintetizar AIA, além do potencial no biocontrole de doenças, poderá favorecer a seleção de estirpes potencialmente úteis para disponibilizar o P agregado a fontes de baixa solubilidade para o uso na agricultura, principalmente nos solos de Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BJORKMAN, T. Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 89-92. 2004.

BUTTERFIELD, R., FISHER, R. Untapped potential: native species for reforestation. **Journal of Forestry**. v. 92, p. 37-40, 1994.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 48, p. 154-161, 2006.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológicas**, p. 485-494. 2008.

CARVALHO FILHO, M. R. ***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento de mudas de eucalipto**. Brasília: Universidade de Brasília. 74p. Dissertação Mestrado. 2008.

DA SILVA, K. L.; DOS SANTOS, A. R.; MATTOS, P. E.; YUNES, R. A.; DELLEMANACHE, F.; CECHIINEL-FILHO, **Therapie**, v. 56, p. 431-433, 2001.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 633-640, 2012.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of índole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1968-1977, 2007.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 43-56. 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; ENJO, E.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA. **Journal of Natural Products**, v. 66 p. 368-371, 2003.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795. 2010.

KHALID, A.; ARSHA, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 473-480, 2004.

KRONKA, F. J. N. et al. Levantamento da vegetação natural e caracterização de um solo no estado de São Paulo. **Anais XI SBSR**, Belo Horizonte, INPE, p. 2779-2785, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.

LUM, M. R.; HIRSCH, A. M. Rots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient limiting environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 368-382, 2003.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S.; DAMASCENO, R. G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAES, T.; CAMARGO, F. A. O.; REARTES, D.S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, v. 33, p. 111-126, 2011.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botanica Brasilica**, v.14, p.113-120, 2000.

MELOTTO, A.; NICODEMO, M. L.; BOCCHESI, R. A.; LAURA, V. A.; GONTIJO NETO, M. M.; SCHLEDER, D. D.; POTT, A.; SILVA, V. P. Sobrevivência e crescimento inicial em campo de espécies florestais nativas do Brasil Central indicadas para sistemas silvipastoris. **Revista Árvore**, v. 33, p. 425-432, 2009.

- MELLO, M. A. R.; LEINER, N. O.; GUIMARÃES, P. R.; JORDANO, P. Size-based fruit selection of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) by bats of the genus *Artibeus* (Phyllostomidae) in a Restinga area, Southeastern Brazil. **Acta Chiropterologica**, v. 7, p. 179-182, 2005.
- NOLDIN, V. F.; DANIELA, B. I.; VALDIR, C. F. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Revista Química Nova**, v. 29, p. 549-554, 2006.
- PIOTTO, D., MONTAGNINI, F., UGALDE, L., KANNINEN, M. Growth and effects of thinning of mixed and pure plantations with native trees in humid tropical Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, v. 177, p. 427-439, 2003a.
- PIOTTO, D., MONTAGININI, F., UGALDE, L., KANNINEN, M. Performance of forest plantations in small and medium-sized farms in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, v. 175, p. 195-204, 2003b.
- PIOTTO, D. **Projeto técnico de reflorestamento fazenda São Gabriel**, 2005. 27p.
- REIS, C. A. F.; SOUZA, A. M.; MENDONÇA, E. G.; GONÇALVES, F. R.; MELO, R. M. G.; CARVALHO, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma floresta paludosa. **Revista Árvore**, v. 33, p. 265-275, 2009.
- SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 966-972, 2010.
- SCARANO, F. R., RIBEIRO, K. T., MORAES, L. F. D.; LIMA, H. C. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in Southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, p. 793-803, 1997.
- SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 847-854, 2002.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1609-1618, 2011.

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L.; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomia Costarricense**, v. 34, p. 99-104, 2010.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

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

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilizadores de fosfatos *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 53-60, 2007.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 11-18, 2007.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCÓN, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. **Plant and Soil**, v. 287, p. 77- 84, 2006.

XAVIER A., WENDLING I., SILVA R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. UFV, 2009. 276 p.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E SINTETIZADORES DE AIA DA RIZOSFERA DE GUANANDI

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E SINTETIZADORES DE AIA DA RIZOSFERA DE GUANANDI

RESUMO

A solubilização de fosfatos por microrganismos é um importante processo para a disponibilização de fósforos às plantas. Com este trabalho, objetivou-se: a) isolar, em meio sólido, microrganismos solubilizadores e não solubilizadores de CaHPO_4 , a partir da rizosfera de guanandi coletado em viveiro e campo; b) quantificar, em meio líquido, a capacidade de solubilização de FePO_4 por isolados rizosféricos de guanandi solubilizadores de CaHPO_4 ; c) quantificar a produção de AIA por microrganismos rizosféricos solubilizadores de FePO_4 , para inocular e maximizar a formação de miniestacas de guanandi. Duas plantas de guanandi, uma cultivada em viveiro e outra em campo foram utilizadas para o isolamento de bactérias e fungos solubilizadores de CaHPO_4 e FePO_4 . Para o teste de solubilização de FePO_4 , os meios foram acrescidos de FePO_4 (1 g L^{-1}) e os isolados incubados sob agitação (7 dias, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$). Após centrifugação, o sobrenadante foi extraído para quantificação do P inorgânico pelo método colorimétrico da vitamina C. Para avaliação da produção de AIA, os meios foram suplementados com triptofano ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e os isolados incubados no escuro sob agitação (72 h, temperatura ambiente). Em seguida, foram centrifugados e o sobrenadante extraído para determinação da concentração de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$), por espectrofotometria. Maior população de microrganismos solubilizadores e não solubilizadores de P é encontrada na rizosfera de muda de guanandi cultivada em campo do que em viveiro. Há maior número de bactérias solubilizadoras de CaHPO_4 e FePO_4 em muda cultivada em campo do que em viveiro. A capacidade de solubilização de FePO_4 e produção de AIA é variável dentre os isolados rizosféricos de guanandi.

Palavras-chave: fósforo, auxina, solubilização de fosfatos.

**ISOLATION AND SELECTION solubilizing microorganisms PHOSPHATES &
Synthesizers IAA OF THE RHIZOSPHERE GUANANDI**

ABSTRACT

The phosphate solubilization by microorganisms is an important process for the provision of matches to plants. This study aimed to: a) isolating, in solid, solubilizing microorganisms and non-solubilizing CaHPO_4 from the rhizosphere of guanandi collected in nursery and field, b) quantify, in liquid medium, the solubilization ability FePO_4 by isolated rhizosphere of guanandi solubilizing CaHPO_4 c) quantify the production of IAA by rhizosphere microorganisms solubilizing FePO_4 , to inoculate and maximize training minicuttings guanandi. Guanandi two plants, one grown under nursery and another field were used for isolation of bacteria and fungi solubilizing FePO_4 and CaHPO_4 . To test solubilization FePO_4 , the media were added to FePO_4 (1 g L^{-1}) and isolates incubated under agitation (7 days, 28°C). After centrifugation, the supernatant was taken for quantification of inorganic P by the colorimetric method of Vitamin C. To evaluate production of IAA, media were supplemented with tryptophan (100 mg mL^{-1}) and isolates incubated in the dark under shaking (72 h, room temperature). They were then centrifuged and the supernatant extracted for determining the concentration of IAA (mg mL^{-1}) by spectrophotometry. Major population of solubilizing microorganisms and solubilizing P is not found in the rhizosphere of changes guanandi grown in the field, than planted in the nursery. There are more than CaHPO_4 solubilizing bacteria and changes in FePO_4 than field-grown nursery. The solubilization ability FePO_4 and production of IAA is variable among isolates of rhizosphere guanandi.

Keywords: phosphorus, auxin, phosphate solubilization.

INTRODUÇÃO

A rizosfera, local em que o solo está em contato direto com as raízes das plantas, é a região onde ocorre a maior parte das interações entre a comunidade microbiana, ou seja, entre os microrganismos e plantas (Luster et al., 2009). Uma grande variedade de microrganismos que vivem próximos ou associados às raízes, sendo estimulados por vários exsudados radiculares, é capaz de promover maior absorção de nutrientes e os transferir para as plantas por diversos mecanismos. Tais microrganismos são denominados de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (PGPR, do inglês *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*). Esse efeito é atribuído a mecanismos como: fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de substâncias reguladoras de crescimento, produção de antibióticos e sideróforos e solubilização de nutrientes como o P (Hayat et al., 2010).

Para Silva Filho (2001), uma parcela importante da comunidade microbiana edáfica possui a habilidade de mineralizar fosfatos orgânicos e, ou solubilizar fosfatos inorgânicos, permitindo a liberação de P assimilável pelas plantas. Tais microrganismos apresentam potencial de utilização como inoculante, visto que podem maximizar o desenvolvimento vegetal (Sahin et al., 2004; Souchie et al., 2005).

Segundo Freitas e Vildoso (2004) e Nelson (2004), microrganismos promotores de crescimento vegetal exercem efeitos benéficos no desenvolvimento das plantas, possibilitam a redução da aplicação de fertilizantes químicos e maximizam o aproveitamento de nutrientes. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento incluem a produção de fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfatos, FBN, síntese de sideróforos e aceleração da mineralização dos nutrientes. Indiretamente, os microrganismos atuam nos mecanismos de indução de resistência sistêmica das plantas, antagonismo a patógenos, aumento da resistência das plantas a situações de estresse e produção de antibióticos (Oliveira et al., 2003).

Alguns microrganismos, denominados PGPR, são capazes de se associarem aos tecidos vegetais, como caules, folhas e raízes, sendo chamados de endofíticos. Um grupo de PGPR endofíticos presentes em diferentes espécies vegetais é formado por bactérias diazotróficas. Os diazotróficos endofíticos não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, porque estão livres de competição com outros microrganismos e podem transferir muito mais eficientemente os compostos essenciais para o desenvolvimento da planta (Dobbelaere et al., 2003).

Segundo Baldani et al. (1997), os microrganismos diazotróficos podem ser divididos em três categorias: (1) endofíticos obrigatórios, que colonizam o interior das raízes e a parte aérea das plantas; (2) endofíticos facultativos, que são capazes de colonizar raízes interna e externamente e (3) microrganismos rizosféricos, espécies que colonizam as raízes superficialmente. Nos últimos anos, estudos e demonstram que várias plantas podem ser colonizadas por bactérias diazotróficas, como por exemplo, plantas de milho associadas com *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado et al., 2004), arroz, com *Serratia marcescens* (Gyaneshwar et al., 2001), trigo, com *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera* (Sala et al., 2008) e sorgo e cana-de-açúcar, com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Medeiros et al., 2006; Luna et al., 2010).

O gênero *Azospirillum* possui espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico e é encontrado na rizosfera de muitas gramíneas (Kennedy et al., 1997). Entretanto, o padrão de colonização das raízes das gramíneas pelas espécies de *Azospirillum* mostra uma tendência de especificidade entre plantas hospedeiras e as bactérias. As espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* têm sido isoladas das raízes e folhas de arroz, milho e trigo (Kim et al., 2005), enquanto *A. amazonense* tem sido mais frequentemente detectada nas raízes de cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2002).

De acordo com Govindarajan et al. (2007), as raízes de gramíneas, como o milho, possuem uma ampla comunidade de rizobactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo o gênero *Serratia*. Prieschmann et al. (2008) isolaram estirpes desse gênero de raízes do milho e constataram que estas bactérias, além de possuírem características promotoras de crescimento, também podem atuar como antagonistas contra fungos fitopatogênicos.

As PGPR, tanto de vida livre como endofíticas, podem beneficiar as plantas por meio de mecanismos de promoção de crescimento de plantas e, algumas dessas apresentam mais de um mecanismo (Ahmad et al., 2008). Gêneros como *Azoarcus*, *Arthrobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum* e *Paenibacillus* são alguns dentre a variedade que podem atuar como promotores de crescimento.

Depois do nitrogênio (N), o P é o segundo elemento mais limitante ao crescimento vegetal. No solo, há grandes reservas deste nutriente nas formas insolúveis, é altamente reativo com elementos como Al, Fe e Ca, tornando indisponível às plantas. Entre as bactérias presentes na rizosfera, algumas são capazes de secretar ácidos

orgânicos e fosfatases que facilitam a conversão das formas insolúveis em solúveis, disponibilizando esse nutriente às plantas (Chen et al., 2006). De acordo com Venieraki et al. (2010), as bactérias solubilizadoras de fosfatos dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos no meio em que o microrganismo se desenvolve, cuja ação é atribuída às propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons Ca, Fe e Al. O ácido mais frequentemente observado entre os solubilizadores de fosfatos é o ácido glucônico, mas foram observados também os ácidos cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico e succínico em diferentes espécies de PGPR (Rodríguez et al., 1999).

As populações de solubilizadores são consideravelmente altas em solos rizosféricos, incluindo bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, entre outras (Rodríguez et al., 2006). A utilização desses microrganismos como inoculantes em culturas de interesse é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional, promovendo melhor aproveitamento do P existente no solo (Silva Filho e Vidor, 2001).

Outro mecanismo utilizado pelas PGPR é a produção de fitormônios, como as auxinas, citocinas e giberelinas. As auxinas são os fitormônios mais importantes das plantas e são produzidas, principalmente, na gema apical do caule e transportadas através das células do parênquima até às raízes. Seu principal efeito é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do fitormônios (Barazani e Friedman, 1999). A principal auxina encontrada nas plantas é o ácido indolacético (AIA) e as PGPR também podem ser produzidos, através da enzima indol-piruvato descarboxilase na presença do aminoácido triptofano (Prinsen et al., 1993). O AIA é sintetizado principalmente em rotas bioquímicas dependentes do triptofano, embora alguns autores já tenham demonstrado algumas vias independentes deste aminoácido (Cohen et al., 2003). Muitas PGPR são capazes de sintetizar AIA e é estimado que 80% das bactérias isoladas da rizosfera podem produzi-lo (Patten e Glick, 1996). Dentre as várias espécies bacterianas, os gêneros *Azospirillum* e *Klebsiella* têm mostrado potencial para produção de AIA sob condições *in vitro*.

Os efeitos da colonização desses gêneros sobre a morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associam são marcantes. São observadas alterações na densidade e no comprimento dos pelos radiculares, resultando no aumento da

superfície do sistema radicular e maximizando a exploração dos nutrientes e água do solo (Gutiérrez-Manero et al., 1996; Solano et al., 2008). Tais efeitos estão associados à capacidade destes e de muitos outros microrganismos rizosféricos liberarem substâncias reguladoras do crescimento. Porém, sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do fitormônio, visto que o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (Ahmad et al., 2005). A solubilização de fosfato em meio sólido pode ser avaliada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, em contraste com o meio opaco (Kang et al., 2002) ou pela solubilização de fosfato em meio líquido, adicionado de fontes insolúveis desse elemento (Kumar et al., 2001; Souchie et al., 2005b).

OBJETIVO GERAL

Com este trabalho, objetivou-se isolar microrganismos rizosféricos de guanandi e avaliar sua capacidade de solubilização de fosfatos e de síntese de AIA *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar, em meio sólido, microrganismos solubilizadores e não solubilizadores de CaHPO_4 , a partir da rizosfera de guanandi coletado em viveiro e campo.
2. Quantificar, em meio líquido, a capacidade de solubilização de FePO_4 por isolados rizosféricos de guanandi solubilizadores de CaHPO_4 .
3. Quantificar a produção de AIA por microrganismos rizosféricos solubilizadores de FePO_4 , para inocular e maximizar a formação de miniestacas de guanandi.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de raízes de guanandi

Uma muda de guanandi foi retirada da reserva florestal da fazenda São Tomaz Olho D'água, no Município de Rio Verde – Goiás, situada na Rodovia Sul Goiana Km 01, Zona Rural, nas coordenadas: “Latitude 17° 48’ 1.692” S e Longitude 50° 53’ 57.0696” W (Figura 1). Coletou-se uma planta de guanandi preservando suas raízes (Figura 2). A planta foi integralmente retirada do solo com o uso de um escavador manual, cuidadosamente manuseado para impedir danos à raiz e preservando grande

quantidade do solo rizosférico (Figura 2). Esta foi então acondicionada em uma caixa térmica de isopor e conduzida ao Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, onde o material foi processado em 24h.

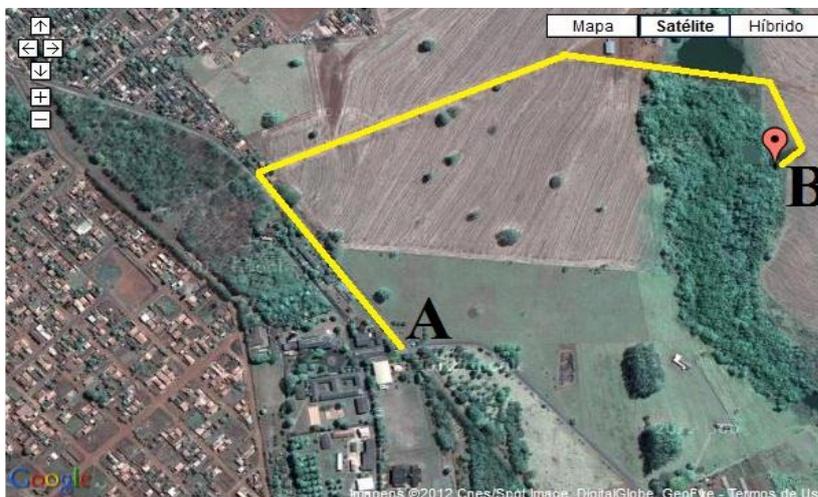


Figura 1. IF Goiano – Campus Rio Verde (A) e Reserva florestal da fazenda São Tomaz Olho D’água (B), em Rio Verde, GO.

No mesmo dia, escolheu-se uma muda de guanandi cultivada por 120 dias em viveiro (tubetes) para coleta de suas raízes, que também foram levadas ao laboratório para proceder o isolamento dos microrganismos rizosféricos.



Figura 2. Muda de guanandi sendo retirada do solo

Isolamento de microrganismos rizosféricos

Foi realizado o isolamento de microrganismos rizosféricos utilizando o meio GELP, adicionado de CaHPO_4 (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). Especificamente, fragmentos de raízes foram coletados com o cuidado para não retirar o solo aderido e assim, transferidos 10g para 90 mL de uma solução salina (0,9%) esterilizada, agitada por 40 minutos e feitas as diluições sucessivas até 10^{-5} , com posterior plaqueamento das diluições 10^{-4} e 10^{-5} , em triplicata.

As placas foram incubadas, por sete dias a 28 °C, em estufa. Diariamente, as placas foram vistoriadas e feita a contagem dos isolados bacterianos e fúngicos que apresentavam halo transparente ao redor da colônia, em contraste com o meio opaco, o que indicava a capacidade de solubilização de CaHPO_4 . Em seguida, com alça de platina, tais isolados foram repicados para placas de Petri, contendo o mesmo meio de isolamento e incubados por quatro dias a 28 °C. Em seguida, os isolados bacterianos e fúngicos foram transferidos para frascos de penicilina contendo, respectivamente, meio de cultura ágar nutriente e BDA e estocados em geladeira.

Posteriormente, os isolados solubilizadores de CaHPO_4 foram cultivados em meio líquido adicionado de FePO_4 (1 g L^{-1}), conforme Gadagi e Sa (2002). Para tanto, alíquotas de 200 μL do pré-inóculo (10^8 UFC mL^{-1}) foram transferidas para tubos de ensaio contendo o referido meio líquido, em triplicata, e incubados durante sete dias a 28 °C. Após o referido período de incubação, a mudança de pH do meio, com conseqüente mudança de cor, foi indicativo de positividade para a solubilização de FePO_4 (Gadagi e Sa, 2002)

Avaliação da produção de AIA por microrganismos rizosféricos de guanandi

Para a avaliação da capacidade de produção de AIA pelos isolados, estabeleceu-se ensaio *in vitro*, conforme Asghar et al. (2002), modificado. Alíquotas de 500 μL do pré-inóculo (10^8 UFC mL^{-1}), foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio Dygs, acrescido de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano (Sigma®). Os frascos foram incubados no escuro (48 h a 30 °C), sob agitação (45 rpm). Após o tempo de incubação, as culturas foram homogeneizadas, transferidas para tubos tipo falcon e centrifugadas (1.200 rpm, 15 min, 4 °C). Em seguida, alíquotas de 3 mL do sobrenadante foram colocadas em potes pretos de filme fotográfico (três repetições por isolado), e acrescentados 2 mL do reagente de Salkowski (1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 mL

de HClO₄ 35%) (Gordon e Werber, 1951). Os potes foram tampados e as soluções deixadas em reação por 30 minutos. A presença de AIA na solução foi observada pela mudança de coloração da solução que se tornou rosa mais intensa, quanto maior a quantidade de AIA presente. As avaliações foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível (530 nm). A concentração de AIA nas soluções foi estimada utilizando curva preparada com meio Dygs, esterilizado e não inoculado, e quantidades conhecidas de AIA sintético (Sigma[®]) (0, 25, 50, 100 e 150 µg AIA mL⁻¹), a partir de uma solução padrão de 300 µg AIA mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 108 microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) rizosféricos na planta coletada em campo, sendo 85 bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) e 23 fungos solubilizadores de fosfato (FSF). A partir da rizosfera da muda coletada em viveiro, não foi possível detectar MSF (Tabela 1). Similarmente, maior número de microrganismos não solubilizadores de P foi detectado a partir da rizosfera da planta de campo, comparado ao total de isolados, deste grupo, obtidos da planta de viveiro (Tabela 1).

Tabela 1. População rizosférica de bactérias (BSF) e fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e não solubilizadores, isolados de guanandi, procedente do campo e de viveiro, em Rio Verde, GO.

Procedência da muda	Não solubilizadores de 1,12x10 ⁷ ----- N° de isolados -----	Solubilizadores de P 1,04x10 ⁶ -----
Campo	435	108 (85 BSF e 23 FSF)
Viveiro	186	nd*

*nd=não detectado

Fungos e bactérias são de grande interesse para a utilização como inoculantes para maximizar a produção de mudas de espécies arbóreas de interesse. Tais microrganismos são capazes de solubilizar fosfatos que, apesar de presentes no solo, estão indisponíveis às plantas, além de produzirem fitormônios.

Neste trabalho, foram detectados 45 MSF (35 BSF e 10 FSF) que solubilizaram FePO_4 e sintetizaram AIA (Tabela 2). Os resultados de densidade populacional de solubilizadores geralmente são muito variáveis. De acordo com Silva Filho (1998), a população de MSF existente varia conforme o local e o método de avaliação.

Tabela 2. Teores de P (mg P mL^{-1}) e ácido indolacético ($\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) detectados em meio líquido, adicionado de FePO_4 e incubado com bactérias (BSF) e fungos solubilizadores de P (FSF) rizosféricos de guanandi.

Isolado	mg P mL^{-1}	$\mu\text{g AIA mL}^{-1}$	BSF	mg P mL^{-1}	$\mu\text{g AIA mL}^{-1}$
BSF1	1,17	0,95	BSF18	1,07	1,62
BSF2	1,21	3,51	BSF19	1,02	1,85
BSF3	1,53	nd	BSF20	0,92	nd
BSF4	1,50	0,99	BSF21	1,66	2,68
BSF5	1,12	1,83	BSF22	1,85	1,60
BSF6	1,16	2,18	BSF23	1,44	1,82
BSF7	1,49	0,81	BSF24	1,72	1,28
BSF8	1,73	2,10	BSF25	1,86	1,80
BSF9	1,86	2,67	BSF26	2,27	2,40
BSF10	1,56	0,48	BSF27	2,07	1,29
BSF11	2,00	0,98	BSF28	1,78	1,81
BSF12	2,00	1,15	BSF29	1,78	1,61
BSF13	1,93	1,34	BSF30	1,81	1,54
BSF14	2,15	1,82	BSF31	1,94	2,13
BSF15	2,18	0,91	BSF32	2,03	1,29
BSF16	2,19	1,75	BSF33	1,99	2,02
BSF17	1,82	1,73	BSF34	2,20	2,55
			BSF35	2,24	1,08
Isolado	mg P mL^{-1}	$\mu\text{g AIA mL}^{-1}$	FSF	mg P mL^{-1}	$\mu\text{g AIA mL}^{-1}$
FSF1	0,58	0,37	FSF6	2,70	0,99
FSF2	2,23	0,69	FSF7	0,87	0,62
FSF3	0,41	nd	FSF8	0,10	0,09
FSF4	2,70	nd	FSF9	2,11	0,38
FSF5	1,36	0,74	FSF10	1,39	0,13

*nd: não detectado.

CONCLUSÕES

- Maior população de microrganismos solubilizadores e não solubilizadores de P é encontrada na rizosfera de muda de guanandi cultivada em campo, e não foi detectada MSF em muda de viveiro.

- Não foi detectada população de bactérias solubilizadores de CaHPO_4 e FePO_4 em muda de guanandi cultivada em viveiro.

- A capacidade de solubilização de FePO_4 e produção de AIA é variável dentre os isolados rizosféricos de guanandi.

- Dois isolados bacterianos (BSF3 e BSF20) e dois fúngicos (FSF3 e FSF4) não foram capazes de produzir AIA e os isolados bacterianos, em média, produziram valores superiores aos fúngicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v. 29: 29–34. 2005.

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

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29: 911-922. 1997.

BARAZANI, O. Z.; FRIEDMAN, J. Is the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**. v. 25: 2397-2406. 1999.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. Sideróforos: Uma resposta dos microrganismos. **Quim Nova**. v. 25: 1155-1164. 2002.

CABALLERO-MELLADO, J, MARTÍNEZ-AQUILAR, M, PAREDES-VALDEZ, G,

ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov. an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54: 1165-1172. 2004.

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

COHEN, J. D.; SLOVIN, J. P.; HENDRICKSON, A. M. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. **Trends Plant Science**. v. 8: 197-199. 2003.

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

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

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S. W.; WEON, H. Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23: 997-1006. 2007.

GUTIÉRREZ-MANERO, F. J.; ACERO, N.; LUCAS, J. A.; PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on European alder growth. Characterization and biological assay of metabolites produced by growth promoting and growth inhibiting bacterial. **Plant and Soil**. v. 182: 67-74. 1996.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-RUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 183: 2634-2645. 2001.

HAYAT, R.; ALI, A.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**. v. 60: 579-598. 2010.

KENNEDY, I. R.; PEREG-GERK, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution on an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**. v. 194: 65-79. 1997.

KIM, C.; KECSKÉS, M. L.; DEAKER, R. J.; GILCHRIST, K.; NEW, P. B.; KENNEDY, I. R.; KIM, S.; SA, T. Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 51: 948-956. 2005.

LUNA, M. F.; GALAR, M. L.; APREA, J.; MOLINARI, M. L.; BOIARDI, J. L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**. v. 32: 1071-1076. 2010.

LUSTER, J.; GÖTTLEIN, A.; NOWACK, B.; SARRET, G. Sampling, defining characterizing and modeling the rhizosphere- the soil science tool box. **Plant and Soil**. v. 321: 457-482. 2009.

MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; REIS, V. M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**. v. 279: 141-152. 2006.

NELSON, L. M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. **Pest Management Science**, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M. de; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Seropédica**: CNPAB, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

OLIVEIRA, A. L. M. DE; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**. v. 242: 205-215. 2002.

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

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VANONCKELEN, H. *Azospirillum brasiliense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **American Physical Society**. v. 6: 609-615. 1993.

PRIESCHMANN, D. A.; LEHMAN, R. M.; CHRISTIE, A. A.; DASHIELL, K. E. Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). **Applied Soil Ecology**. v. 40: 417-431. 2008.

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

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**. v. 287: 15-21. 2006.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; GARBOGGINI, F. F.; NOGUEIRA, N. L.; DA SILVEIRA, A. P. D. *Achromobacter insolitus* and *Zoogloea ramigera* associated with wheat plants (*Triticum aestivum*). **Biology and Fertility of Soils**. v. 44: 1107-1112. 2008.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 36: 1495-1508. 2001.

SYLVESTER-BRADLEY R.; ASKAWA N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fósforo na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**. V 1. p.12-22. 1982.

SOLANO, B. R.; MAICAS, J. B.; MANERO, F. J. G. **Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)**. In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds) *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley. p. 41-52. 2008.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology in Health and Disease**. V. 61. P 277-285. 2010.

SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**. v. 265, p. 123-129. 2004.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v. 35, p. 329-334. 2005.

CAPÍTULO 2

PROPAGAÇÃO CLONAL DE GUANANDI, INOCULADO COM MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E PRODUTORES DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Propagação clonal de guanandi inoculado com microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de ácido indolacético

RESUMO

O guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente desde a América Central até a América do Sul. No Brasil, tem alto valor econômico pela ampla utilização para os mais diversos fins, tais como construção civil, marcenaria e construção naval. Estudos sobre sua multiplicação em viveiro possibilitam produções homogêneas em plantios de escalas comerciais, além de favorecer a manutenção de seu germoplasma. Com este trabalho, objetivou-se: a) avaliar a influência dos substratos areia e Bioplant[®] na emergência de sementes de guanandi, em casa de vegetação; b) verificar a viabilidade do processo de propagação clonal para o guanandi; c) avaliar o desenvolvimento de miniestacas de guanandi, após a inoculação de MSF e produtores de AIA. Para o cultivo em viveiro, foram utilizadas 400 sementes em substrato areia e Bioplant[®]. Foram utilizadas 400 sementes em substrato areia (200) e Bioplant[®] (200). Foi constatado que o substrato areia é o mais indicado para a emergência de sementes de guanandi, já que possibilita maior percentual de germinação, menor custo e maior facilidade de manuseio que o substrato Bioplant[®]. A miniestaquia se mostrou uma eficiente estratégia para a propagação de guanandi, podendo ser indicada em programa de silvicultura clonal para fins comerciais, já que a taxa de estabelecimento das miniestacas é alta e a fisiologia das mudas, quanto ao processo fotossintético, não é afetado negativamente. A inoculação do isolado bacteriano BSF maximiza as variáveis fotossintéticas avaliadas, além da biomassa seca radicular de miniestacas de guanandi.

Palavras-chave: emergência, miniestaquia, substrato, mudas, *Calophyllum brasiliense* Cambess.

**Clonal propagation of guanandi inoculated with phosphate solubilizing
microorganisms and producers of IAA**

ABSTRACT - The guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) is a naturally occurring tree species from Central America to South America in Brazil, has high economic value due to its extensive use for various purposes, such as construction, carpentry and shipbuilding. Studies on their multiplication in nurseries enable homogeneous productions in scale commercial plantations, besides favoring the maintenance of their germplasm. This work aimed to: a) evaluate the influence of substrates and sand Bioplant ® in emergency seed guanandi in a green house, b) verify the feasibility of the process of clonal propagation for guanandi c) evaluate developing minicuttings guanandi after inoculation and MSF producers AIA. For cultivation in nurseries, 400 seeds were used in sand and Bioplant ®. A total of 400 seeds in sand (200) and Bioplant ® (200). It was found that the sand substrate is the most suitable for emergency seed guanandi as it enables higher germination percentage, lower cost and greater ease of handling the substrate Bioplant ®. The minicutting proved to be an efficient strategy for propagating guanandi and may be indicated in clonal forestry program for commercial purposes, since the rate of establishment of the shoots is high and physiology of seedlings, as the photosynthetic process is not adversely affected. Inoculation of bacterial isolate BSF maximizes photosynthetic variables evaluated, besides the dry biomass of root cuttings of guanandi.

Keywords: emergency, minicutting, substrate, seedlings, *Calophyllum brasiliense* Cambess.

INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um aumento na demanda por serviços e produtos florestais, em especial, na produção de mudas para a recuperação de áreas degradadas, revegetação, reflorestamento para fins econômicos, restauração de matas ciliares, arborização, entre outros fins. Esta demanda crescente indica a necessidade do desenvolvimento de pesquisas e técnicas que aperfeiçoem a produção de mudas, com custos competitivos e qualidade morfofisiológica capaz de atender aos objetivos dos plantios (Santos et al., 2006).

Segundo Souza et al. (2009) e Souza (2009) entre as espécies com potencial de uso em projetos de reflorestamento para fins econômicos, que necessitam de mais estudos, encontram-se o guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess.). De acordo com Lisboa et al. (2012), o guanandi produz uma média anual de $20 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, sendo uma espécie com potencial para a silvicultura pela qualidade de sua madeira, inúmeras possibilidades de utilização e as grandes dimensões dos indivíduos adultos.

Várias espécies florestais, especialmente as nativas, produzem sementes intensamente em um ano e modestamente em outro, sendo definido tal comportamento como ciclicidade de produção (Fowler e Martins, 2001). Desta forma, a propagação vegetativa tem relevância no setor florestal brasileiro, onde seu uso é justificado quando não há disponibilidade de genótipos de alta produtividade e, ou sementes e os insumos são limitados. Nestas condições, as técnicas de propagação vegetativa podem distribuir, com maior rapidez e eficiência, os resultados de programas de melhoramento genético que buscam a conservação de espécies florestais nativas ou o estabelecimento de plantios com características mais apropriadas aos produtos esperados (Silva et al., 2010).

Pouco se conhece sobre a miniestaquia, como técnica de propagação vegetativa aplicada às espécies florestais nativas do Brasil, tanto em nível experimental como comercial. Portanto, o uso de reguladores de crescimento é apontado por sua influência direta no processo de propagação, sendo que estas aplicações têm possibilitado o enraizamento de propágulos vegetativos, em que os ácidos indolacético (AIA) e indolbutírico (AIB) são os mais utilizados (Brondani et al., 2008). Entretanto, geralmente, o custo da aplicação de reguladores de crescimento é elevado. Desta forma, a inoculação de microrganismos rizosféricos selecionados, produtores de fitormônios e,

ou solubilizadores de fosfatos (MSF), traduz-se em alternativa mais barata e eficaz para maximizar a produção de mudas de espécies arbóreas de forma clonal.

Há escassez de informações disponíveis sobre as técnicas mais adequadas para a produção de mudas de guanandi, a coleta de sementes e a condição de luz mais favorável para sua germinação e desenvolvimento. Quando a propagação é feita por semeadura, primeiramente é necessário escolher um método de obtenção das sementes que seja eficiente e forneça sementes de boa qualidade.

Segundo Longman (2003), a colheita preferencialmente deve ser feita diretamente na copa e não a coleta com uso de panos estendidos no chão ou sobre o solo. Segundo esse autor, o primeiro método reduz a taxa de predação e remoção dos frutos, evita que as sementes se percam ou acumulem umidade e possibilita a identificação segura da árvore mãe. Além disso, em espécies com frutos deiscentes e sementes aladas, pode ser difícil obter quantidade satisfatória de sementes no chão e aquelas presentes em frutos que caíram antes de se abrir, podem não apresentar embrião suficientemente desenvolvido.

Ao conhecer os altos e baixos das atividades agropecuárias sabe-se que, as duas únicas atividades seguras para investir, em que não haverá a mínima possibilidade de surgir competidores que derrubem os preços dos produtos, são os setores de Água e Madeiras nobres (Lei). De acordo com Carvalho, (2003), durante a formação, tem-se um custo e retorno financeiro na formação por 01 há de guanandi (Quadro 01). Com o desenvolvimento, coloca-se a venda os subprodutos durante a formação: da madeira de menor diâmetro que vai sendo desbastada (molduras, painéis decorativos, artesanatos, barris de vinho, etc); das sementes, folhas e galhos das podas para indústrias farmacêuticas; das sementes, para reprodução a partir do 5º ano.

Segundo Lorenzi, (1992), cultivando tecnicamente, uma tora de eucalipto (para indústria moveleira) leva 18,5 anos para se formar. O guanandi leva o mesmo tempo, porém agrega valor a sua terra pelo plantio e formação de mata nobre, na hipótese de venda da terra, ela valerá mais com a madeira em cima (valor agregado). Será mais atrativa e valorizada. Dependendo apenas do capricho, tratos, adubação, para crescer mais rápido.

De todas as arbóreas nativas brasileiras, é a mais resistente em terrenos alagadiços, embora desenvolva muito em solos pobres e secos. O modo de se plantar o guanandi é igual ao eucalipto e pinus. Porém, a sua rentabilidade vale 20 vezes mais que

a do eucalipto, pinus e outras culturas, recebendo assim denominação de Eucalipto Brasileiro o Ouro Verde Brasileiro (Quadro 02).

Quadro 1. Custo e retorno financeiro de 01 ha de guanandi (R\$)

A- CUSTO DESEMBOLSADO	Ano 1 (R\$)	Ano 2 ao 10 (R\$)	Ano 11 a 18 (R\$)	Total (R\$)
1. Operação mecanizada	952,00	1.376,00	665,60	2.993,60
2. Insumos: calcário, adubos, defensivos e mudas	3.271,00	3.650,00	-	6.921,00
3. Mão de obra	545,00	877,00	744,00	2.166,00
4. Colheita	-	1.030,92	2.319,58	3.350,50
5. Assistência técnica e administração	143,04	1.287,36	1.144,32	2.574,72
SUBTOTAL - A	4.911,04	8.221,28	4.876,50	18.008,82
B- Custo de oportunidade: terra e capital (10% a.a)		18.649,35		18.649,35
C- Beneficiamento da matéria		5.670,09	12.757,69	18.427,78
D- Imposto da venda da madeira (12%)		16.915,00	38.058,75	54.973,75
CUSTO TOTAL		54.366,76	55.689,94	110.056,70
Receita Bruta		140.958,35	317.156,28	458.114,63
Receita Líquida		86.591,59	261.466,34	348.057,93

Quadro 2. Quadro comparativo de rentabilidade do guanandi com outras culturas

Produto	Produtividade (ha)	Preço de venda (março/2011)	Custo (ha/unidade)	Faturamento Bruto/Safra (R\$)	Rendimento líquido (ha/ano)
Guanandi	307m ³ (18 anos)	1.491,00/m ³	55.689,94	458.114,63	19.336,55
Mogno-africano	307m ³ (15 anos)	1.491,00/m ³	54.732,23	458.114,63	23.267,70
Eucalipto	350m ³ (7 anos)	48,00/m ³	5.908,00 (16,88m ³)	16.800,00	1.556,00
Cana-de-açúcar	90 t (média)	54,00 t	3.690,00 (41,00/t)	4.860,00	1.170,00
Soja	50 sc	41,30/sc	1.353,40 (32,77/sc)	2.065,00	711,6
Milho	160 sc	23,00/sc	3.012,80 (18,83/sc)	3.680,00	667,2

Segundo Cruz (2007), produzir mudas de espécies florestais nativas sempre foi um desafio. Podendo destacar, entre vários fatores, as dificuldades de se trabalhar com várias espécies, pelo fato de cada uma possuir uma determinada característica fisiológica. O profissional responsável pelo gerenciamento de um viveiro de produção de mudas nativas deve, entre outros conhecimentos, possuir domínio sobre as características peculiares de cada espécie produzida. Para Cruz (2007), a produção de

mudas de espécies florestais nativas vem crescendo junto com o interesse de empresas privadas, no que se refere à conservação de florestas nativas. Essa grande demanda é consequência das ações de manutenção e conservação dos recursos naturais, realizadas por entidades públicas e privadas, ações que favorecem a biodiversidade brasileira e melhorias na qualidade de vida.

Nestas condições, muitas espécies, assim como o guanandi, possuem restrições para a produção de mudas por sementes, tais como: regularidade para obtenção de sementes durante todo o ano, alta variação na taxa de germinação (15 a 90%) e tempo de germinação longo (cerca de 145 dias) (Scalon et al., 2008). Portanto, a propagação vegetativa se torna uma alternativa para superar tais desafios. Dentre os processos de propagação vegetativa, a miniestaquia é uma técnica utilizada com sucesso na maximização do processo de propagação clonal em *Eucalyptus*, visando contornar as dificuldades de enraizamento de alguns clones (Xavier e Wendling, 1998).

A miniestaquia pode ser considerada uma especialização da estaquia convencional. Basicamente, consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de estaquia ou mudas produzidas por sementes (Alfenas et al., 2004), dispensando o rejuvenescimento *in vitro* (Wendling et al., 2000). É uma alternativa que pode suprir a necessidade do resgate da juvenilidade do material vegetativo, apontada por diversos autores como limitante da capacidade de indução radicial, geradas pelo processo de maturação (Silva e Silva et al., 2007).

Para Fachinello et al. (2005), outro fator que afeta o enraizamento é o tipo da estaca utilizada, há uma variação fisiológica ao longo do ramo, uma vez que aquelas provenientes de diferentes porções do mesmo ramo, tendem a diferir quanto ao enraizamento. As propriedades físicas, químicas e biológicas do substrato para cultivo das miniestacas também afetam diretamente o enraizamento e o desenvolvimento da muda produzida (Higashi et al., 2000). O conhecimento destes fatores é primordial para o domínio da técnica de miniestaquia.

Hartmann et al. (2002) afirmam que aplicações exógenas de auxinas podem proporcionar maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento de plantas propagadas assexuadamente. Os fitormônios AIA e AIB têm apresentado maior eficiência na promoção de raízes adventícias, em estacas de espécies florestais, em razão de sua menor mobilidade e maior estabilidade química no interior da estaca. A concentração utilizada varia de acordo com a espécie, clone, estado de

maturação, tipo de estaca, condições ambientais, forma e tempo de aplicação (Xavier et al., 2009).

OBJETIVO GERAL

Com este trabalho, buscou-se avaliar a eficiência da técnica de miniestaquia para a propagação, sobrevivência, enraizamento e vigor de guanandi, em substrato inoculado com MSF e sintetizadores de AIA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a influência dos substratos areia e Bioplant[®] na emergência de sementes de guanandi, em casa de vegetação.
2. Verificar a viabilidade do processo de propagação clonal para o guanandi.
3. Avaliar o desenvolvimento de miniestacas de guanandi, após a inoculação de MSF e produtores de AIA.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal do IF Goiano – Campus Rio Verde (Figura 1).

Figura 1. Casa de vegetação do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal



Origem das Sementes

Foram utilizadas sementes de guanandi adquiridas da empresa Tropical Flora Reflorestadora e Central de Vendas de Sementes, situada em Santo André, SP.

Escolha das Sementes

As sementes foram selecionadas, visual e manualmente, separando os melhores exemplares (Figura 2 A), desinfestadas pela imersão em Standak Top[®] (2 min) e, posteriormente, semeadas em bandejas (50 x 35 x 8 cm), contendo areia ou Bioplant[®] (Figura 2 B).

Em cada substrato, as sementes dispostas e perfiladas em número de 10 colunas com 10 fileiras, totalizando 100 sementes cada bandeja (200 sementes em cada substrato) (Figura 3A e B). Após a semeadura, as sementes foram levemente cobertas com substrato correspondente da bandeja e, mantidas úmidas e monitoradas diariamente, para avaliar sua emergência.



Figura 2. Sementes de guanandi (A) e substrato Bioplant[®] (B)



Figura 3. Disposição das sementes de guanandi nos substratos Bioplant[®] (A) e areia (B).

Após 85 dias da semeadura, as mudas que apresentavam bom desenvolvimento e ótimo aspecto fitossanitário (Figura 4) foram selecionadas, colhidas das bandejas e padronizadas para a instalação do ensaio. Em seguida, as mesmas foram mergulhadas, por 10 segundos em Standak Top[®] e transferidas para os tubetes que continham o substrato Bioplant[®] (Figura 5), contendo 25 miniestacas cada tratamento, perfazendo um total de 125 miniestacas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente

ao acaso, constituído de cinco tratamentos de inoculação e 25 repetições. Os inoculantes foram preparados com a melhor bactéria solubilizadora de P e que também sintetizava AIA (BSF34), o melhor fungo solubilizador de P e sintetizador de AIA (FSF6) e o melhor isolado de *Trichoderma* isolado de guanandi e pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da instituição. Para o tratamento 1, foi inoculado BSF34 + *Trichoderma*, tratamento 2 FSF6 + *Trichoderma*, tratamento 3 BSF34, tratamento 4 FSF6 e o tratamento controle consistiu na ausência da inoculação de MSF e, ou produtores de AIA.

Para o preparo dos inoculantes líquidos, os isolados foram cultivados (72 h a 28 °C) em caldo nutriente e caldo batata, para bactéria e fungo, respectivamente. Após a incubação, tiveram sua concentração ajustada para 10^8 UFC mL⁻¹. No caso do inoculante bacteriano, foram coletados 3 mL de cada cultura para determinação da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro e ajuste para 0,5. Já o inoculante fúngico teve sua concentração de esporos contada em câmara de Neubauer e calculada com auxílio do software CALIBRA (Embrapa Meio Ambiente, 2011). Para ambos os inoculantes, foi utilizada solução salina (0,9%), para correção da concentração de células, quando necessária. Todos os isolados microbianos foram inoculados na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (1 mL miniestacas⁻¹).



Figura 4. Mudanças de guanandi, originárias de sementes, aos 85 dias após sementeira em substrato areia (A) e Bioplant[®] (B).

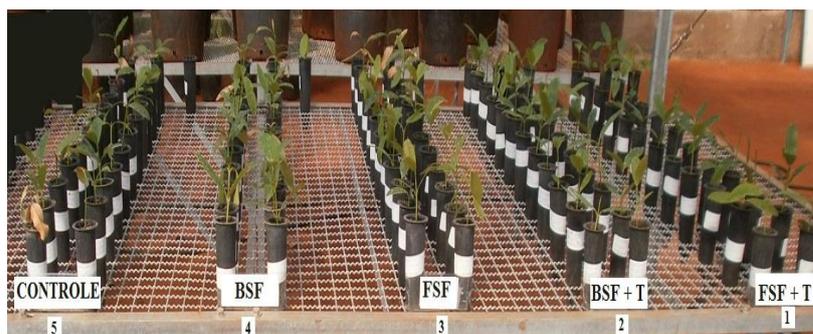


Figura 5. Miniestacas de guanandi cultivadas em substrato Bioplant® e inoculadas com MSF e sintetizadores de AIA.

As plantas foram irrigadas manualmente quatro vezes ao dia (7, 11, 14 e 18h). Após 45 dias do estabelecimento das miniestacas e inoculação dos MSF, foram feitas avaliações de fluorescência da clorofila, trocas gasosas e clorofila A, B e total. As avaliações de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas nas folhas das plântulas utilizadas nas medições das trocas gasosas. Nestas medições, foi utilizado um fluorômetro modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Tais análises foram feitas segundo Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989) e usando as terminologias e cálculos propostos por Snel e Van Kooten (1990).

Para as avaliações de trocas gasosas foram determinadas a taxa de fotossíntese líquida (*A*), a condutância estomática (*g_s*), a relação entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (*C_i/C_a*) e a taxa transpiratória (*T*), utilizando um analisador de gases no infravermelho portátil (IRGA), modelo LI-6400 (LiCor, Nebraska, EUA).

A medição da clorofila A, B e total foi realizada com o medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG® (modelo CFL 1030). O clorofilômetro é um sensor comercial que analisa três faixas de frequência de luz na medição e, através de relações de absorção de diferentes frequências, determina um Índice de Clorofila (Índice de clorofila Falker), considerando a presença de clorofila A e B (Falker, 2008).

Avaliação do sistema radicular

Para esta avaliação, foram colhidas três mudas, aleatoriamente, de cada tratamento de inoculação e analisados: comprimento (cm), volume (cm³), área (cm²), diâmetro ponderado de raízes (mm) e biomassa seca radicular. As raízes foram separadas da parte aérea, lavadas cuidadosamente e expostas em fundo preto. Imagens

foram captadas com uma câmera digital (1024 x 768 pixels, Olympus[®], modelo FE4020), e posteriormente analisadas pelo software SAFIRA (Sistema de Análise de Fibras e Raízes), desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária (Rodrigues, 2008). Para avaliação da biomassa seca radicular, as raízes foram acondicionadas em pacotes de papel e levadas para estufa com temperatura de 90 °C, durante 72h.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando o software Sisvar versão 5.1 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento de emergência de sementes

As sementes iniciaram a emergência no 10º dia após a semeadura para o substrato areia e 12º dia para o substrato Bioplant[®]. Os maiores picos de emergência ocorreram no 17º dia após a semeadura, nas bandejas com o substrato areia e, ao 23º dia, nas bandejas com Bioplant[®] (Figura 5). No 60º dia após a semeadura, observou-se que no substrato areia, a taxa de germinação apresentou pouca ou nenhuma emergência (Figura 6). Após 85 dias da semeadura, verificou-se 85% de emergência no substrato areia e 78% no substrato Bioplant[®] (Figura 5).

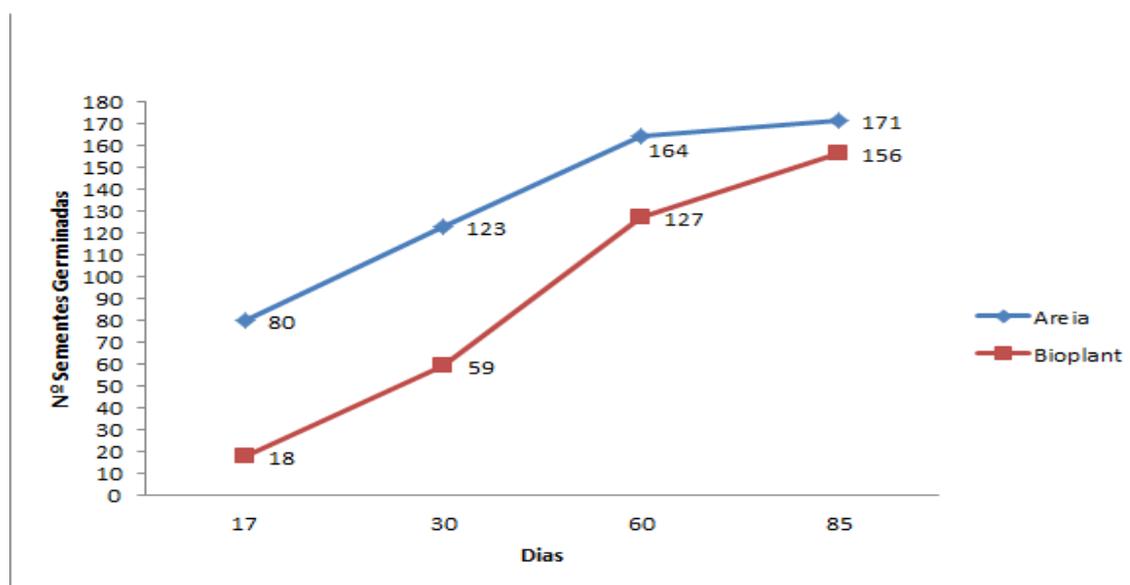


Figura 6. Sementes de guanandi germinadas aos 17, 30, 60 e 85 dias após a semeadura, nos substratos areia e Bioplant[®].

Foi constatada a ausência da degradação dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e *b*, indicando que as miniestacas de guanandi não estavam se desenvolvendo sob condições de estresse abiótico (Tabela 1). O ideal é que, em plantas, a razão Fv/Fm esteja na faixa entre 0,75 e 0,85 (Silva et al., 2007), indicando ausência de estresse biótico ou abiótico e sinaliza para o bom desenvolvimento vegetal. Neste trabalho, todas as mudas de guanandi submetidas aos diversos tratamentos de inoculação, apresentaram valores praticamente situados na referida faixa, corroborando o fato que não havia, no momento da colheita, nenhum tipo de estresse que afetasse negativamente o aparato fotossintético (Tabela 1). Silva et al. (2007) relatam que valores abaixo da faixa supracitada indicam danos fotooxidativos, causados por fotoinibição no centro de reação do fotossistema II.

Tabela 1. Clorofila A, B e total e razão Fv/Fm de mudas de guanandi, originárias de miniestacas, inoculadas com bactérias (BSF), fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e *Trichoderma* (T) e cultivadas em substrato Bioplant®

	Controle	FSF+T	FSF	BSF+T	BSF
Cl_a	30,78a	32,67a	31,12a	33,48a	32,78a
Cl_b	7,31a	8,85a	7,03a	9,05a	9,53a
Cl_{Total}	38,10a	41,51a	38,15a	42,53a	42,32a
Fv/Fm	0,73a	0,72a	0,69a	0,77a	0,70a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Quanto às avaliações de trocas gasosas, foi observado que a inoculação de BSF e de BSF+T incrementou a taxa fotossintética das mudas de guanandi (Figura 7A). Observação mais detalhada confirma que tal efeito foi desencadeado pela inoculação da BSF e não pelo isolado de *Trichoderma* sp. Também foi observado que a inoculação desses mesmos tratamentos favoreceu maior taxa transpiratória (Figura 7C). Além disso, a inoculação de BSF incrementou a condutância estomática, comparado aos demais tratamentos de inoculação e ao controle (Figura 7D). Portanto, a inoculação de tal isolado bacteriano, de forma direta ou indireta, favoreceu o processo fotossintético nas mudas que receberam tal inoculante, que resultou, na sequência, em maior produção da biomassa seca radicular (Figura 7).

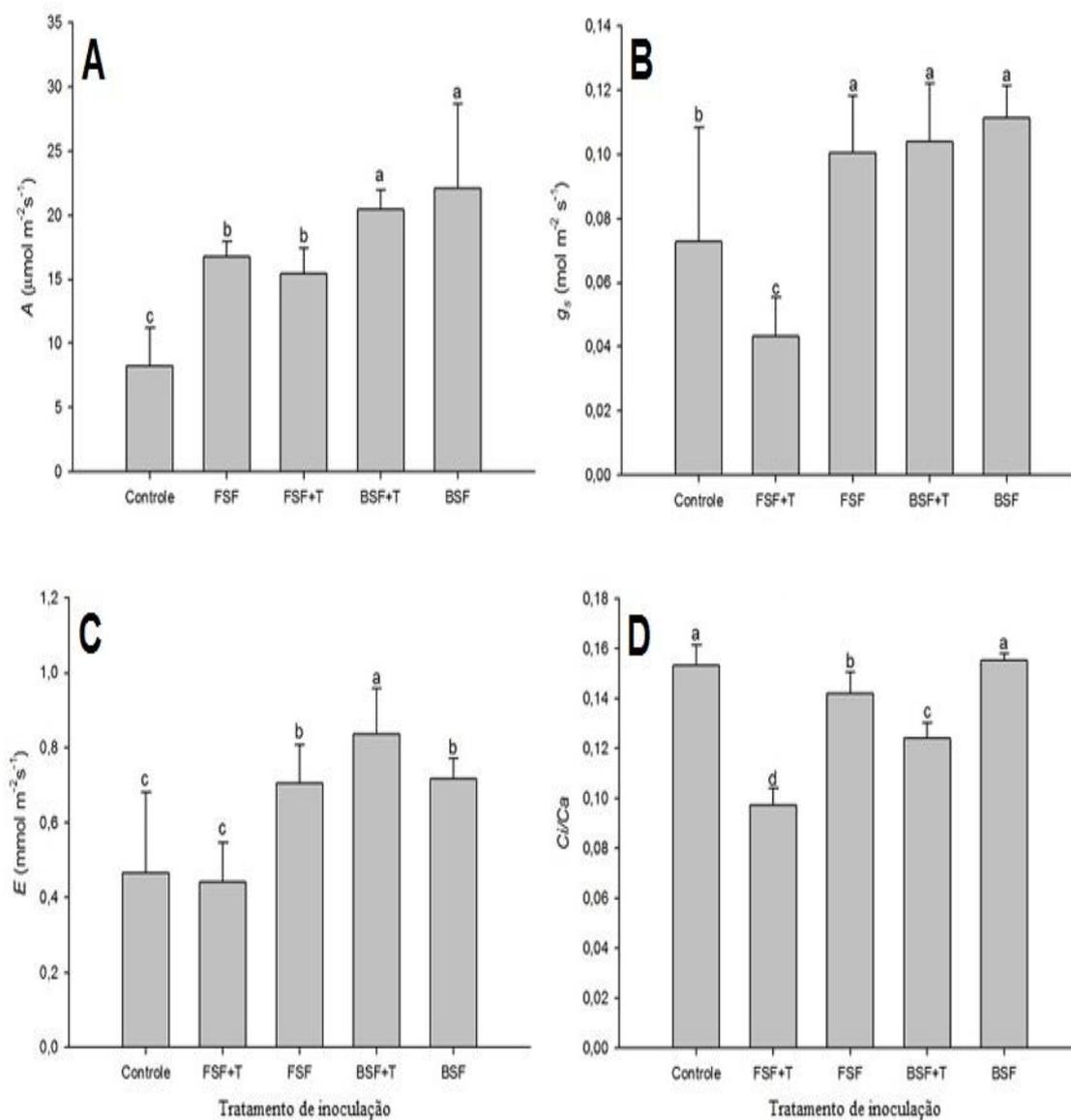


Figura 7. Taxa fotossintética (A), Condutância estomática (B), Taxa transpiratória (C) e C_i/C_a (D), em miniestacas de guanandi, aos 45 dias após o plantio em substrato Bioplant[®], inoculado com bactérias (BSF), fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e produtores de AIA e *Trichoderma* (T). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Especificamente, quanto à produção de biomassa radicular, não foi constatada diferença entre a inoculação de BSF, BSF+T e FSF+T, porém estes superaram ao tratamento com FSF e controle não inoculado (Tabela 2). Os tratamentos de inoculação não resultaram em incremento do comprimento, área e diâmetro do sistema radicular (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliações do sistema radicular de plantas de guanandi originárias de miniestacas, inoculadas com bactérias (BSF), fungos solubilizadores de fosfato (FSF) e *Trichoderma* (T) e cultivadas em substrato Bioplant[®]

Tratamentos	Comprimento (cm)	Área (cm ²)	Volume (cm ³)	Diâmetro (mm)	Biomassa seca (g)
FSF+T	75,5 a	91,8 a	114,0 a	0,9 a	0,15 a
BSF+T	54,4 a	172,0 a	22,9 b	1,4 a	0,21 a
BSF	96,4 a	117,3 a	14,3 b	1,1 a	0,17 a
FSF	69,5 a	74,0 a	81,2 a	0,9 a	0,06 b
Controle	34,1 a	49,2 a	77,3 a	1,1 a	0,04 b
CV (%)	35,1	39,9	34,3	26,4	43,5

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

CONCLUSÕES

O substrato areia é o mais indicado para a emergência de sementes de guanandi já que possibilita maior percentual de germinação, menor custo e maior facilidade de manuseio que o substrato Bioplant[®].

A miniestaquia se mostrou uma eficiente estratégia para a propagação clonal, podendo ser indicada em programa de silvicultura clonal para fins comerciais, já que a taxa de estabelecimento das miniestacas é alta e a fisiologia das mudas, quanto ao processo fotossintético, não é afetado negativamente.

A inoculação do isolado bacteriano BSF34 maximiza as variáveis fotossintéticas avaliadas, além da biomassa seca radicular de miniestacas de guanandi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A.; NEPSTAD, D.; McGRATH, D.; MOUTINHO, P.; PACHECO, P.; DIAZ, M. C. V.; SOARES FILHO, B. **Desmatamento na Amazônia: indo além da “emergência crônica”**. IPAM, 2004. 89p.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. UFV. 2004. 442p.

ALMEIDA, F. D. et al. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, v. 31, p. 455-463, 2007.

ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA, p. 93-121. 2007.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M. A.; PIRES, P. P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, v. 9, p. 153-158, 2008.

CARPANEZZI, A. A. **Fundamentos para a reabilitação de ecossistemas florestais**. In: GALVÃO, A. P. M.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V. (org.). **Restauração florestal: Fundamentos e Estudos de Caso**, Colombo: Embrapa Florestas, p. 27-45. 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 485-494, 2003.

CRUZ, B. S. Influência da adubação fosfatada no incremento em altura de mudas de guanandi (*calophyllum brasiliensis*). **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. v. 11 p. 22-34, 2007.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agroambiente**, v. 4, p. 102-109. 2010.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil**, Circular Técnica IPEF, n. 192, São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, p. 11. 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Circular Técnica IPEF, n. 194, São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2002. 21p.

LISBOA, A. C.; SANTOS, P. S.; OLIVEIRA NETO, S. N.; CASTRO, D. N.; ABREU, A. H. M. Efeito do volume de tubetes na produção de mudas de *Calophyllum brasiliense* e *Toona ciliata*. **Revista Árvore**, v. 36, p. 603-609. 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum, 1992. 352p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. **Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030**, 2008. 4p.

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

FONSECA, G. F.; LEÃO, N. V. M.; SANTOS, A. M. Germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de *Pseudopiptadenia psilostachya* (dc.) G.P.LEWIS & M.P.LIMA (leguminosae) em diferentes ambientes de luz. **Revista Árvore**, v. 30, p. 885-891, 2006.

FOWLER A. P.; MARTINS E. G. **Manejo de sementes de espécies florestais**. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2001. 76 p. (Embrapa florestas. Documentos, 58).

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 th Ed., Prentice Hall, New Jersey, 2002. 880 p.

LENTINI, M.; VERÍSSIMO, A.; SOBRAL, L. **Fatos florestais da Amazônia**. Imazon, 2003. 110p.

JORGE, L. A. C.; RODRIGUES, A. F.O. **Safira: sistema de análise de fibras e raízes**. São Carlos: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária, 21p. 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 24).

LONGMAN, K. A. **Raising seedlings of tropical trees**. London: Commonwealth Science Council, 2003. 156p.

MCLAREN, K. P.; MCDONALD, M. A. The effects of moisture and shade on seed germination and seedling survival in a tropical dry forest in Jamaica. **Forest Ecology and Management**, v. 183, p. 61-75. 2003.

SANTOS, P. S.; LISBOA, A.C.; NETO, S. N.; GRUGIKI, M. A.; FERREIRA, M. A. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. **Revista Floresta e Ambiente**, v.13, p. 68-78, 2006.

SCALON, S. P. Q.; KODAMA, F. M.; SCALON FILHO, H.; MUSSURY, R. M. Crescimento inicial de mudas de sangra-d'água (*Croton urucurana* Baill.) sob sombreamento e aplicação de giberelina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 10, p.61-66, 2008.

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L.; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomia Costarricense**, v. 34, p. 99-104, 2010.

SILVA. K. E. **Jacareúba (*Calophyllum brasiliense* Cambess)**. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia, n. 11. 2005.

SILVA, R. L. da.; OLIVEIRA, M. L. de; MONTE, M. A.; XAVIER, A. , Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomía Costarricense**, v. 34, p. 99-104. 2010.

SILVA, B.M.; LIMA, J. D.; DANTAS, V. A. V.; MORAES, W. S.; SABONARO, D. Z. Efeito da luz no crescimento de mudas de *Hymenaea parvifolia* Huber. **Revista Árvore**, v. 31, p.1019-1026. 2007.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p.193-201, 2007.

SOUZA, M. R.; ALMADO, R. P. **Produção de mudas na CAF Santa Bárbara Ltda. Miniestaquia clonal em *Eucalyptus* sp.** In ROCHA, M. G. B. **Melhoramento de**

espécies arbóreas nativas. Minas Gerais: Instituto Estadual de Florestas, 2002. 171 p.

SOUZA, A. F. **Crescimento, alocação de biomassa e eficiência de uso de água por mudas de *Eucalyptus urograndis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Calophyllum brasiliense* e *Toona ciliata*.** 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SCHREIBER U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 9, p. 261–272, 1986.

SNEL, J. F. H.; VAN KOOTEN, O. The use of chlorophyll fluorescence and other noninvasive spectroscopic techniques in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, p.146–332, 1990.

SOUZA, J.C.A.V.; BARROSO, D.G.; CARNEIRO, J.G.A.; TEIXEIRA, S.L.; BALBINOT, E. Propagação vegetativa do cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. *Revista Árvore*, v.33, p.205-213, 2009.

UHL, C.; BARRETO, P.; VERÍSSIMO, A.; BARROS, A.C.; AMARAL, P.; VIDAL, E. Uma abordagem integrada de pesquisa sobre manejo dos recursos florestais na Amazônia brasileira. In: GASCON, C.; MOUTINHO, P. (Eds). **Floresta Amazônica: dinâmica, regeneração e manejo.** Manaus: INPA, p. 313-331, 1998.

WENDLING, I. XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, p. 187-192, 2000b.

WENDLING, I. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação.** Viçosa, 105f. 2002. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. *Revista Árvore*, v.27, p.139-143, 2003.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.), **Revista**

Árvore, v. 27, p. 351-356, 2003b.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV. 2009. 272 p.