



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA LUIZ DE SOUZA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS PROMOVIDAS POR  
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS EM MUDAS DE *CARINIANA*  
*ESTRELLENSIS* (RADDI) KUNTZE (LECYTHIDACEAE)  
CULTIVADAS EM VIVEIRO**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATÁLIA LUIZ DE SOUZA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS PROMOVIDAS POR  
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS EM MUDAS DE *Cariniana  
estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae)  
CULTIVADAS EM VIVEIRO**

---

Londrina

2019

NATÁLIA LUIZ DE SOUZA

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS PROMOVIDAS POR  
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS EM MUDAS DE *CARINIANA*  
*ESTRELLENSIS* (RADDI) KUNTZE (LECYTHIDACEAE)  
CULTIVADAS EM VIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientadora: Profa. Dra. Renata Stolf Moreira

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Souza, Natália Luiz.

Respostas ecofisiológicas promovidas por bactérias associativas em mudas de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) cultivadas em viveiro. / Natália Luiz Souza. - Londrina, 2019.  
57 f. : il.

Orientador: Renata Stolf Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019. Inclui bibliografia.

1. *Azospirillum brasilense* - Tese. 2. *Bacillus* sp. - Tese. 3. Processo fotossintético Tese. 4. Mudas para reflorestamento - Tese. I. Stolf-Moreira, Renata . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Discente: **Natália Luiz de Souza**

Título: **“Respostas ecofisiológicas promovidas por bactérias associativas em mudas de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) cultivadas em viveiro”**

Data da Defesa: **22 de fevereiro de 2019 às 8:30 horas, na sala 10 da Universidade Estadual de Londrina.**

**Banca Examinadora**

**Parecer**

**PRESIDENTE:**

Dra. Renata Stolf Moreira

UEL

APROVADA

**TITULARES:**

Dr. José Antonio Pimenta

UEL

APROVADA

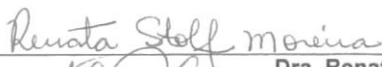
Dra. Liliane Marcia Mertz Henning

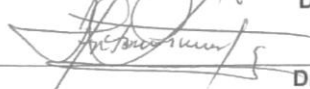
Embrapa  
Soja

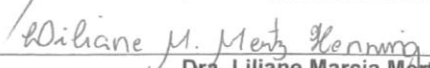
APROVADA

**Parecer Final**

APROVADA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Renata Stolf Moreira

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Antonio Pimenta

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Liliane Marcia Mertz Henning

*“Porque dEle, e por meio dEle,  
e para Ele são todas as coisas.  
A Ele seja a glória para sempre. Amém!”*  
Romanos 8:31

## AGRADECIMENTOS

À Deus por cuidar de todos os detalhes nessa jornada e me permitir chegar até aqui;

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira por me ajudar a encontrar o equilíbrio quando parecia que tudo estava perdido, pelos conselhos seja pessoalmente, pelo celular ou por email rs, pela amizade, orientação e todos os ensinamentos na graduação e no mestrado;

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Edmilson Bianchini e ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Halley Caixeta de Oliveira pelas sugestões e correções feitas na qualificação;

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> José Antonio Pimenta e a Dr<sup>a</sup> Liliane Marcia Mertz Henning por aceitarem o convite para fazer parte da banca e pela imensa contribuição para a melhoria do trabalho final;

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEFIV) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em especial as “fofinhas” Jé e Pati pelos momentos compartilhados... desmontagens até altas horas, trabalhos e provas assustadoras, almoços, cafezinhos! Seguimos caminhos diferentes a partir de agora, mas construímos algo que será sempre lembrado independente da distância física;

Aos funcionários do viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da UEL. Um agradecimento mais que especial ao Odair C. Pavão mais conhecido como “Oda” por me ajudar com os transplantes, por se dispor a cuidar com tanto carinho das minhas mudas enquanto eu não estava presente seja desentupindo os bicos dos irrigadores quase que diariamente ou as vezes até mudando-as para um lugar melhor.

E por fim mas não em último lugar, aos meus pais e minha irmã que sempre acreditaram em mim, até mesmo quando eu não era capaz de acreditar. Vocês são a maneira mais expressiva pela qual Deus demonstra o cuidado dEle com a minha vida... Obrigada por serem a calma nos momentos de desespero, a esperança nos momentos de frustração e por sempre me lembrarem que há um tempo e um propósito para todas as coisas!

E a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente na realização do meu trabalho,

MUITO OBRIGADA!

SOUZA, Natália Luiz. **Respostas ecofisiológicas promovidas por bactérias associativas em mudas de *Cariniana estrellensis* (RADDI) Kuntze (Lecythidaceae) cultivadas em viveiro.** 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Dentre as metodologias de restauração da vegetação neotropical tem-se a produção de mudas em viveiro, uma vez que mudas que se desenvolveram em viveiros podem apresentar maiores chances de sobreviverem em áreas de reflorestamento. Inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) podem ser uma alternativa para um manejo sustentável de ecossistemas e auxiliar direta e indiretamente no crescimento de mudas de espécies arbóreas. Apesar das BPCP apresentarem potencial para favorecer o crescimento das mudas em diversas condições ambientais, não existem estudos envolvendo essa associação em viveiros. Este estudo analisou o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) no desenvolvimento de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) mantidas na sombra e em sol pleno. Foram avaliados de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de crescimento capazes de indicar interferência dessa associação na vitalidade de mudas cultivadas em viveiros. As sementes foram germinadas em três sementeiras sendo uma regada com inóculo de Ab-V5, outra com inóculo de ZK sendo a concentração dos inóculos 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) mL<sup>-1</sup>) e outra não inoculada (N.in) regada com água. Ao atingirem cerca de 5 cm de parte aérea, as plântulas foram transplantadas para tubetes e houve adição de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> dos respectivos inóculos e água nas N.in. As mudas de *C. estrellensis* foram mantidas sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos reduzida em relação ao sol pleno (setor de crescimento) por 40 dias, até que as três primeiras folhas estivessem completamente expandidas. Houve então nova adição de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> dos inóculos de acordo com os tratamentos nas sementes em todas as mudas e 50% delas foram submetidas a sol pleno (setor de aclimação), onde ficaram mais 40 dias. Ao final do experimento (80 dias) foram realizadas análises fisiológicas, bioquímicas e de crescimento com o intuito de determinar a influência das BPCP no desenvolvimento de *C. estrellensis*. A inoculação com Ab-V5 e ZK induziu aumento na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, eficiência intrínseca do uso da água e eficiência máxima do fotossistema II em relação às N.in. Mudas inoculadas com ZK, no geral, apresentaram maior teor de pigmentos fotossintetizantes que mudas não inoculadas, possivelmente devido ao fato de que a associação com BPCP pode aumentar a disponibilidade de nutrientes como ferro e nitrogênio, que estão envolvidos na biossíntese dos pigmentos. Houve ainda incremento na biomassa de mudas inoculadas com Ab-V5 em relação às N.in indicando que a inoculação pode facilitar a absorção de nutrientes que melhoram o desenvolvimento vegetal. Diante dos resultados obtidos é possível concluir que, a inoculação com Ab-V5 e ZK pode melhorar a qualidade das mudas produzidas em viveiros, garantindo maior sucesso nos programas de reflorestamento.

**Palavras-chave:** Aclimação. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus* SP. Processo fotossintético. PAL. Reflorestamento.

SOUZA, Natália Luiz. **Ecophysiological responses promoted by associative bacteria in seedling of *Cariniana estrellensis* (RADDI) Kuntze (Lecythidaceae) cultivated in nursery.** 2019. 56 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Among the methodologies of restoration of neotropical vegetation is the production of seedlings in nursery, since seedlings that have developed in nurseries may present greater chances of surviving in areas of reforestation. Inoculants containing plant growth-promoting bacteria (PGPB) may be an alternative for sustainable management of ecosystems and can directly and indirectly assist in the growth of seedlings of tree species. Although PGPB have the potential to favor the growth of the seedlings in diverse environmental conditions, there are no studies involving this association in nurseries. This study analyzed the effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) and *Bacillus* sp. (ZK) in the development of *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) kept in the shade and in full sun. Physiological, biochemical and growth parameters that could indicate interference of this association in the vitality of seedlings grown in nurseries were evaluated. The seeds were germinated in three pots, one being inoculated with Ab-V5, the other inoculated with ZK inoculum being  $10^6$  colony-forming units (CFU mL<sup>-1</sup>) and the uninoculated (U.in) irrigated with water. When they reached about 5 cm of shoot, the seedlings were transplanted to tubes and there was addition of  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> of the respective inoculum and water in the U.in. The *C. estrellensis* seedlings were maintained under reduced photosynthetic photon flux density relative to the full sun for 40 days (growth sector), until the first three leaves were fully expanded. There was a new addition of  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> of the inoculum according to the treatments in the seeds in all the seedlings and 50% of them were submitted to full sun (acclimatization sector), where they remained another 40 days. At the end of the experiment (80 days), physiological, biochemical and growth analyzes were carried out to determine the influence of PGPB on the development of *C. estrellensis*. Inoculation with Ab-V5 and ZK induced an increase in CO<sub>2</sub> net assimilation, intrinsic water use efficiency and maximum efficiency of photosystem II in relation to U.in. ZK-inoculated seedlings, in general, had a higher content of photosynthetic pigments than U.in seedlings, possibly by the fact the association with PGPB can increase the availability of nutrients such as iron and nitrogen, which are involved in pigment biosynthesis. There was also an increase in the biomass of seedlings inoculated with Ab-V5 in relation to U.in indicating that inoculation may facilitate the absorption of nutrients that improve plant development. In view of the results obtained, it is possible to conclude that inoculation with Ab-V5 and ZK can improve the quality of seedlings produced in nurseries, thus ensuring greater success in reforestation programs.

**Key words:** Acclimatization. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus* SP. PAL. Photosynthetic process. Reforestation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exemplar de *Cariniana estrellensis* com as sementes. ....24
- Figura 2** - **A**: Sementes germinadas em bandeja com areia; **B**: Plântulas transplantadas para tubetes. ....26
- Figura 3** - **A**: Setor de crescimento com DFFF reduzida em relação ao sol pleno; **B**: Setor de aclimação onde as mudas foram expostas ao sol pleno. ....27
- Figura 4** - **A**: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (**A**); **B**: Condutância estomática (**g<sub>s</sub>**); **C**: Eficiência intrínseca no uso da água (**EiUA, A/g<sub>s</sub>**); **D**: Eficiência máxima do fotossistema II (**F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>**) em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **B** e **D**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . ....33
- Figura 5** - **A**: Clorofila a (**Chl a**); **B**: Clorofila b (**Chl b**); **C**: Clorofilas totais (**Chl total**); **D**: Carotenoides (**Car**) em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e expostas ao sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **A**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . ....34
- Figura 6** - **A**: Taxa de transporte de elétrons (**J**); **B**: Uso das trioses fosfato (**TPU**) de mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. \*\* =  $p \leq 0,01$ . ....36
- Figura 7** - **A**: Área foliar (**AF**); **B**: Área foliar específica (**AFE**); **C**: Diâmetro do caule (**DC**); **D**: Comprimento da parte aérea (**CPA**) em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre

mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **A** e **C**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . .....37

**Figura 8 - A:** Massa seca de folha (**MSF**); **B:** Massa seca de caule (**MSC**); **C:** Massa seca de raiz (**MSR**); **D:** Massa seca total (**MST**) de mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **A**, **B** e **D**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . .....38

**Figura 9 - Nitrogênio foliar total (NFT)** em  $g\ kg^{-1}$  de massa seca de mudas *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença na média para a mesma inoculação entre **Sb** e **Sp**. .....39

**Figura 10 - A:** Atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (**PAL**); **B:** Polifenol oxidase (**PPO**) em *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. \*\* =  $p \leq 0,01$ . .....39

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Histórico de desmatamento na Mata Atlântica desde o início do monitoramento do Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. .... 14

**Tabela 2** - **PSL**: Ponto de saturação luminoso; **A<sub>sat</sub> CO<sub>2</sub>**: Taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> em concentração saturante de CO<sub>2</sub>; **ETR<sub>max</sub>**: Taxa máxima de transporte de elétrons do fotossistema II ; **V<sub>cmax</sub>**: Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**), mantidas na sombra e sob sol pleno. Os valores são as médias ± erro padrão. Letras minúsculas comparam as inoculações na sombra e letras maiúsculas comparam as inoculações sob sol pleno. Letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). O asterisco indica diferença entre as médias para a mesma inoculação entre sombra e sol pleno. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ..... 35

## LISTA DE ABREVIACOES

A	Taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
AF	rea foliar
AFE	rea foliar específica
$A_{\text{sat CO}_2}$	Taxa fotossintética líquida saturada de CO <sub>2</sub>
Car	Carotenoides
Chl a	Clorofila a
Chl b	Clorofila b
Chl total	Clorofilas totais
CPA	Comprimento da parte aérea
DC	Diâmetro do caule
$EiUA$	Eficiência intrínseca no uso da gua
$ETR_{\text{max}}$	Velocidade máxima de transporte de elétrons
$F_v/F_m$	Eficiência máxima do fotossistema II
$g_s$	Condutância estomática
$J$	Taxa de transporte fotossintético de elétrons
MSC	Massa seca do caule
MSF	Massa seca das folhas
MSR	Massa seca de raiz
MST	Massa seca total
NFT	Nitrogênio foliar total
PAL	Fenilalanina amônia liase
PCL	Ponto de compensação luminoso
PPO	Polifenol oxidase
PSL	Ponto de saturação luminoso
$TPU$	Uso de trioses fosfato
$V_{\text{cmax}}$	Taxa máxima de carboxilação de Rubisco

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	MATA ATLÂNTICA E A PRODUÇÃO DE MUDAS EM VIVEIROS .....	13
1.2	ECOFISIOLOGIA E ACLIMATAÇÃO DE MUDAS .....	15
1.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM PLANTAS .....	18
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1	LOCAL DO EXPERIMENTO E MATERIAL VEGETAL .....	23
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	24
4.3	ANÁLISES FISIOLÓGICAS.....	27
4.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	29
4.4.1	Dosagem de Pigmentos .....	29
4.4.2	Dosagem de Nitrogênio Foliar Total .....	29
4.4.3	Dosagem da Atividade da Fenilalanina Amônia Liase (PAL) e Polifenol Oxidase (PPO) .....	30
4.5	ANÁLISES DE CRESCIMENTO .....	31
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1	PROCESSO FOTOSSINTÉTICO.....	32
5.2	ANÁLISES DE CRESCIMENTO.....	36
5.3	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA .....	39
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
6.1	PROCESSO FOTOSSINTÉTICO.....	40
6.2	ANÁLISES DE CRESCIMENTO.....	42
6.3	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA .....	43
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>44</b>
	<b>Apêndice - Resultados da análise de variância de dois fatores (Luminosidade e Inoculação) em mudas de <i>Cariniana estrellensis</i>.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MATA ATLÂNTICA E A PRODUÇÃO DE MUDAS EM VIVEIROS

Tem sido evidente a necessidade da restauração de ambientes degradados de modo a promover o restabelecimento de processos ecológicos que contribuirão com a gradual reconstituição do ecossistema, bem como de sua biodiversidade. A Mata Atlântica, por exemplo, ocupava quase 1.300.000 km<sup>2</sup> ao longo de 17 estados brasileiros, porém nas últimas décadas aproximadamente 90% da vegetação original deste bioma foi perdida e a vegetação remanescente, confinada em pequenos fragmentos (FUNDAÇÃO SOS Mata Atlântica e INPE, 2018; RIBEIRO et al., 2009). Devido à fragmentação de habitats, a recuperação florestal tornou-se um componente das estratégias políticas que visam a manutenção de espécies locais e redução de catástrofes como a erosão e perda de solos (MMA, 2017; RODRIGUES et al., 2009).

Desde a colonização do Brasil, a extração de lenha, exploração ilegal de madeira, desenvolvimento de estradas e uso intensivo da terra para agricultura contribuíram direta ou indiretamente para a redução da vegetação original da Mata Atlântica (ALMEIDA, 2016; FREITAS; HAWBAKER; METZGER, 2010). Diversos programas visam conservar a vegetação remanescente, porém, as taxas de desmatamento nos fragmentos florestais nos últimos 20 anos têm se mantido relativamente constante (Tab. 1), e no período de 2015-2016 o desmatamento atingiu cerca de 290 km<sup>2</sup> de Mata Atlântica.

**Tabela 1** - Histórico de desmatamento na Mata Atlântica desde o início do monitoramento do Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica.

<b>Desmatamento Observado</b>	<b>Área total desmatada (ha)</b>	<b>Taxa anual de desmatamento (km<sup>2</sup>)</b>
<b>Período de 2008 a 2010</b>	30.366	151.830
<b>Período de 2010 a 2011</b>	14.090	140.900
<b>Período de 2011 a 2012</b>	21.977	219.770
<b>Período de 2012 a 2013</b>	23.948	239.480
<b>Período de 2013 a 2014</b>	18.267	182.670
<b>Período de 2014 a 2015</b>	18.433	184.330
<b>Período de 2015 a 2016</b>	29.075	290.750
<b>Período de 2016 a 2017</b>	12.562	125.620

Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica e INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2016-2017. São Paulo, 2018. (Modificado)

De acordo com o Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa (PLANEVEG), estima-se que há, pelo menos, 12 milhões de hectares de vegetação nativa a ser recuperada, sendo que, cerca de três milhões poderão ser recuperados de maneira natural, por rebrotamento dos indivíduos cortados e/ou germinação das sementes dos bancos e os outros nove milhões pelo plantio de mudas nativas (MMA, 2014, 2017).

A regeneração natural é a estratégia de recuperação mais vantajosa economicamente, porém existem restrições devido à falta de remanescentes naturais, o estado de degradação do solo e a ausência de banco de sementes na área a ser recuperada. Desta forma, o plantio de mudas torna-se a opção mais viável de recuperação, mesmo havendo déficit na produção de sementes e mudas de espécies arbóreas nativas no Brasil. Isso ocorre devido ao incentivo à produção de mudas exóticas economicamente importantes, como eucalipto (DALDEGAN; SAMBUICHI, 2017; SILVA; MARQUES; SAMBUICHI, 2016).

Um levantamento realizado por Silva et al. (2015) mostrou que, de um total de 1276 viveiros apontados como potenciais produtores de mudas e sementes de espécies florestais neotropicais, apenas 246 viveiros confirmaram a real produção dessas mudas e desses, menos de 30% vendem somente espécies neotropicais. Os viveiros geralmente apresentam condições ambientais associadas ao desenvolvimento das plantas, porém algumas dessas condições como, temperatura, água em abundância e alta umidade relativa do ar, favorecem o desenvolvimento de

microrganismos fitopatogênicos capazes de prejudicar o desenvolvimento vegetal (GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER; SANTOS, 2001; PAZ, 2009). Assim, a escassez de infraestrutura e planos de manejo de doenças, a demanda irregular ao longo dos biomas brasileiros aliada a falta de sementes e mudas de qualidade são os principais problemas enfrentados pelos viveiristas (SILVA et al., 2015).

O processo de produção das mudas de espécies arbóreas usualmente é composto por três etapas: 1- Germinação: a semeadura que pode ser realizada em sementeiras ou tubetes, onde ocorre o desenvolvimento inicial das plântulas; 2- Crescimento: desenvolvimento das plântulas em área coberta por tela sombrite com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) reduzida em relação ao sol pleno, onde as mudas permanecem até atingirem o tamanho ideal para serem transferidas para o próximo setor; 3- Rustificação: as mudas são mantidas em sol pleno, expostas à alta luminosidade e temperatura. Essa fase de rustificação é de grande importância pois permite a aclimação das mudas, por meio de ajustes fisiológicos e estruturais que podem aumentar as chances dessas mudas se desenvolverem nas condições ambientais encontradas em áreas desflorestadas (CRAVEN et al., 2011; LIMA et al., 2014; WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002). É importante destacar que as condições de ambientes que foram desmatados são consideravelmente diferentes das condições originais do local, seja pela redução na disponibilidade de água no solo, ciclagem ineficiente de nutrientes e/ou aumento na intensidade luminosa e temperatura (GUARIGUATA; OSTERTAG, 2001). Desse modo, mudas que desenvolveram certo grau de resistência em viveiros podem ter maiores chances de se desenvolverem em ambientes que foram modificados.

## **1.2 ECOFISIOLOGIA E ACLIMATAÇÃO DE MUDAS**

A luz é um recurso fundamental para o desenvolvimento vegetal e é capturada por pigmentos, como as clorofilas localizadas nos complexos antena, que transferem a energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas I e II. No fotossistema II ocorre a oxidação fotossintética da água levando a liberação de oxigênio e doação de elétrons, por meio da cadeia de transporte de elétrons, para o fotossistema I onde ocorre a redução de NADP<sup>+</sup> em NADPH. A oxidação fotossintética da água e a oxidação da plastoquinona são responsáveis por produzir os prótons que, no lúmen dos tilacóides, geram o gradiente de potencial eletroquímico o qual é a força

motriz para a fosforilação de ADP em ATP. O conjunto dessas reações faz parte da etapa fotoquímica da fotossíntese (TAIZ et al., 2017).

Em locais com pouca luz disponível, o rendimento fotossintético depende da eficiência da captura de energia luminosa pelos pigmentos da antena e envio para o centro de reação. Já em sol pleno, como nos setores de rustificação, o excesso de energia luminosa pode progressivamente fechar os centros de reação em virtude de saturação, de modo que a energia disponível seja muito maior que a fração utilizada na fotossíntese, culminando em acúmulo de energia (RUBAN, 2009). O excedente de energia é prejudicial ao aparelho fotossintético, pois, além de inativar o fotossistema II, fenômeno chamado de fotoinibição (dinâmica ou crônica), pode afetar o reparo do fotossistema por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e superóxidos ( $^{\cdot}O_2^-$ ) e, causar danos oxidativos aos lipídeos e proteínas das células vegetais (GURURANI; VENKATESH; TRAN, 2015; NISHIYAMA; MURATA, 2014).

A fotoinibição dinâmica está relacionada à redução reversível na eficiência fotossintética e aumento de mecanismos dissipadores de energia na forma de calor conhecido como *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e xantofilas ou, ativação de complexos enzimáticos antioxidantes como, ascorbato peroxidase, superóxido desmutase e outros. Na fotoinibição crônica, a eficiência quântica e a taxa máxima de fotossíntese são reduzidas devido à danos irreversíveis na proteína D1 no fotossistema II que pode ser completamente removida e sintetizada de novo para que o funcionamento do fotossistema seja reestabelecido (ADAMS et al., 2006; DERKS; SCHAVEN; BRUCE, 2015; GUIDI; TATTINI; LANDI, 2017; NISHIYAMA; MURATA, 2014).

Os produtos da etapa fotoquímica da fotossíntese são utilizados na etapa bioquímica, na qual ocorre a carboxilação de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), resultando em duas moléculas de 3-fosfoglicerato que serão reduzidas a trioses fosfato e poderão ser convertidas em amido no cloroplasto ou exportadas para o citosol para a formação de sacarose (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008; TAIZ et al., 2017). A taxa líquida de assimilação de gás carbônico ( $CO_2$ ) ( $A$ ) é influenciada por processos biofísicos, que incluem o transporte de  $CO_2$  através das folhas e estômatos; processos bioquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides, estroma, mitocôndrias e citosol da célula

e, variáveis ambientais como intensidade de luz e temperatura (SHARKEY et al., 2007).

O modelo mais frequentemente utilizado para compreender as respostas fotossintéticas de plantas C3 mediante a perturbações, como as [CO<sub>2</sub>] atmosféricas, é o de Farquhar; von Caemmerer; Berry (1980), no qual as reações da etapa bioquímica da fotossíntese podem ser diretamente influenciadas por três fatores: 1- *Limitação imposta pela Rubisco*: Em baixas concentrações de CO<sub>2</sub>, *A* é determinada pela capacidade da Rubisco carboxilar a RuBP; 2- *Limitação imposta pela regeneração da RuBP*: Nessa fase, o uso da RuBP é constante e a limitação da fotossíntese pode ocorrer pela capacidade do transporte de elétrons e enzimas envolvidas no ciclo de Calvin (exceto Rubisco) de regenerar a RuBP. Assim, quanto maior for a [CO<sub>2</sub>] mais RuBP é consumida e maior será a necessidade de regeneração; 3- *Limitação pelo uso das trioses-fosfato (TPU)*: Nessa condição, a capacidade da folha em usar os produtos da etapa bioquímica é menor que a quantidade produzida e *A* não responde ao aumento de CO<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub> (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008; SHARKEY et al., 2007; YAMORI; NAGAI; MAKINO, 2011).

Parâmetros como velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{cmax}$ ), respiração do dia ( $R_{day}$ ), taxa de transporte de elétrons ( $J$ ), condutância mesofílica ( $g_m$ ) e uso das trioses fosfato ( $TPU$ ), são facilmente calculados pelo modelo criado por Sharkey et al. (2007) e permitem a interpretação da fotossíntese foliar considerando mecanismos bioquímicos e biofísicos. Rocha et al. (2018) analisaram a influência da suplementação de nitrogênio no crescimento de *Guazuma ulmifolia* em viveiro e constataram que, mudas cultivadas sob sol pleno com suplementação de nitrogênio apresentaram aumento de  $J$  e  $g_m$  em relação as mudas mantidas na sombra com quantidade basal de nitrogênio, enquanto  $TPU$  e  $R_{day}$  não diferiram entre os tratamentos.

Nos últimos anos, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de buscar alternativas que aumentem a qualidade das mudas diante das condições encontradas em viveiros por meio de estratégias de rustificação. Mudas de espécies arbóreas neotropicais submetidas à rustificação em viveiro por 168 dias apresentaram redução da área foliar, espessamento do parênquima paliçádico e, em algumas espécies, aumento na taxa transpiratória, indicando que a rustificação pode melhorar a qualidade morfo-fisiológica e favorecer o estabelecimento das mudas em campo (CALZAVARA et al., 2015). Mudas de *Aegiphila integrifolia*, *G. ulmifolia* e *Heliocarpus*

*popayanensis* que inicialmente estavam no setor de crescimento e depois foram transferidas para o setor de rustificação, adquiriram características de rustificação. Dentre elas, aumento na taxa fotossintética e redução na condutância estomática resultando em maior eficiência no uso da água, aumento de espessura do parênquima paliádico e maior alocação de biomassa para as raízes (MAZZANATTI et al., 2016).

Como dito anteriormente, a exposição prolongada a altas intensidades de luz nos locais de rustificação pode interferir no desenvolvimento de espécies arbóreas e, no caso de *G. ulmifolia*, foi observado que folhas maduras (completamente expandidas no momento da transferência para o setor de rustificação) sofreram fotoinibição crônica, enquanto as folhas que atingiram a expansão completa sob sol pleno foram capazes de dissipar o excesso de energia. Assim, a produção de novas folhas foi uma importante estratégia no processo de rustificação de *G. ulmifolia* (CALZAVARA et al., 2017). A adubação nitrogenada em mudas de *G. ulmifolia* que cresceram no setor de crescimento por 90 dias e depois foram transferidas para o setor de rustificação por 45 dias, preveniu a depressão ao meio-dia do fotossistema II e queda na assimilação de CO<sub>2</sub> sugerindo possível proteção contra fotoinibição dinâmica (ROCHA et al., 2018).

### **1.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM PLANTAS**

Novas estratégias têm surgido com o objetivo de obter mudas de espécies arbóreas de maior qualidade e em menor tempo. Dentre estas estratégias encontra-se a inoculação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP). As BPCP são microrganismos benéficos que colonizam a região ao redor das raízes, conhecida como rizosfera ou, os tecidos internos das plantas. Elas são capazes de fornecer nutrientes essenciais ou facilitar o acesso a esses nutrientes, bem como conferir maior tolerância as plantas frente a estresses bióticos e abióticos (GLICK, 2012; SANTOYO et al., 2016). Comumente as BPCP são aplicadas na agricultura visando à redução do uso intensivo de fertilizantes químicos, de modo a reduzir os impactos ambientais por eles causados, atuando como uma prática relevante para o manejo sustentável do solo e redução nos problemas ambientais (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009; BAEZ-ROGELIO et al., 2017; HUNGRIA, 2011).

Apesar de as BPCP possuírem potencial para auxiliar na recuperação de áreas que sofreram algum tipo de distúrbio ecológico (GALAVIZ et al., 2018; MORENO et al., 2017; SINGH; VAISH; SINGH, 2016) tais como áreas desmatadas e

consequentemente, solos erodidos, poucos estudos envolvendo a utilização de BPCP em espécies arbóreas neotropicais no Brasil estão disponíveis na literatura.

Dentre as BPCP utilizadas neste estudo, têm-se as bactérias associativas do gênero *Azospirillum* que fixam o N<sub>2</sub> por possuírem a nitrogenase, enzima que rompe a tripla ligação entre os átomos de nitrogênio levando a redução de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) em amônia (NH<sub>3</sub>) e assim, fornecem parte da quantidade necessária de nitrogênio para as plantas (HUNGRIA, 2011). Embora o N<sub>2</sub> represente cerca de 80 % dos gases atmosféricos, as plantas não são capazes de utilizá-lo como nutriente devido à forte ligação existente entre os dois átomos de N (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Um estudo realizado com milho inoculado com *Azospirillum brasilense* mostrou que as plantas mantidas em baixa concentração de N apresentaram maior conteúdo de amônio, aminoácidos e açúcares solúveis totais, além de modificações no padrão anatômico das raízes, em relação ao não inoculado (CALZAVARA et al., 2018).

As BPCP podem modular a produção de hormônios-chave para o crescimento vegetal como auxinas (AIA), uma vez que a capacidade de síntese desse hormônio é distribuída entre gêneros como *Azospirillum*, *Rhizobium* e o gênero *Bacillus* utilizado neste estudo, dentre outros. Assim, maiores concentrações de AIA são disponibilizadas para as plantas com as quais estas bactérias se associam (GOES et al., 2012; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). As auxinas promovem o desenvolvimento de raízes, o que resulta em aumento na absorção de água e nutrientes envolvidos na geração de energia e síntese de ácidos nucleicos, além de estimularem a divisão, extensão e diferenciação celular (GLICK, 2012; LUGTENBERG et al., 2013). A caracterização bioquímica de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Methylobacterium*, isoladas de girassol, mostrou que a síntese de AIA foi amplamente distribuída entre bactérias isoladas, com valores variando entre 93,34 a 1653,37 μM AIA por μg de proteína (GOES et al., 2012).

Outro fato observado na associação de plantas e algumas estirpes de BPCP é o aumento no fornecimento de nutrientes como fósforo (P), elemento envolvido na fotossíntese e oxidações biológicas, além de ser encontrado nos fosfolípídeos que compõem as membranas vegetais (TAIZ et al., 2017). A disponibilização desse nutriente ocorre por meio da solubilização de fosfatos minerais, associada principalmente a alterações no pH que podem ocorrer pela produção de ácidos orgânicos, como succinato e citrato, ou incremento de prótons no solo

(BULGARELLI et al., 2013; GLICK, 2012). Além do fósforo, BPCP podem facilitar a aquisição de ferro, que embora seja abundante no solo não é facilmente disponibilizado às plantas devido à baixa solubilidade dos óxidos de ferro. A disponibilização de ferro pelas BPCP ocorre pela produção de compostos quelantes (sideróforos) que se ligam eficientemente ao ferro retirando-o da forma complexa e possibilitando a aquisição pelas plantas (BULGARELLI et al., 2013).

Bactérias isoladas por Goes et al. (2012) apresentaram índice de solubilização de fosfato e de produção de sideróforos que variou de 1,25 a 3,89 e, 1,15 a 5,25, respectivamente, resultados que permitiram a identificação de possíveis candidatos para o desenvolvimento de biofertilizantes. Ribeiro et al. (2018) avaliaram quatro estirpes de *Bacillus* sp. em relação à capacidade de solubilizar fosfato de ferro e produzir sideróforos, sendo que as quatro estirpes solubilizaram o fosfato e três delas foram capazes de produzir sideróforos, promovendo também o crescimento de *Pennisetum glaucum* em solos com diferentes concentrações de fósforo.

A associação com BPCP pode influenciar na defesa vegetal e dentre os principais mecanismos de redução na incidência e severidade de doenças estão: a competição pelo nicho ecológico ou substrato, já que ao colonizar a rizosfera, as BPCP utilizam a maioria dos nutrientes disponíveis, reduzindo a proliferação de microrganismos patogênicos; produção de aleloquímicos e indução de resistência nas plantas hospedeiras (CHOUDHARY; PRAKASH; JOHRI, 2007; HAAS; KEEL; REIMMANN, 2002; JAIN et al., 2013). Análises realizadas *in vitro* e *in vivo* comprovaram a eficiência de oito estirpes de *Bacillus* sp. em reduzir o crescimento de *Botrytis cinerea* e *Calonectria gracilis*, ambos fungos patogênicos causadores do mofo cinzento e podridão das raízes, respectivamente, doenças que acometem tecidos jovens de *Eucalyptus* spp. (PAZ et al., 2018).

Em relação à indução de resistência em plantas as duas formas amplamente estudadas são a resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). A SAR é desencadeada pela exposição da planta a microrganismos patogênicos, mediada pelo aumento nas concentrações de ácido salicílico e que resulta na produção de proteínas relacionadas à patogênese como quitinase. Já a ISR é ativada por microrganismos não patogênicos como BPCP e mediada por rotas que envolvem o ácido jasmônico e etileno. Esses compostos são responsáveis por ativar o sinal transmitido pelo floema à região distal da planta de modo que haja ativação de genes relacionado à defesa fazendo com que o sistema

defensivo das plantas contra futuros desafios bióticos seja potencializado (CHOUDHARY et al., 2016).

A ISR, em sua maioria, é detectada por meio do aumento na atividade de enzimas relacionadas com a defesa vegetal como fenilalanina amônia liase (PAL), polifenol oxidase (PPO), catalase, superóxido desmutase e outras, quando os receptores das plantas reconhecem a presença de um patógeno (CHOUDHARY; PRAKASH; JOHRI, 2007; DRESSEN et al., 2017; JAIN et al., 2013; MADADKHAH et al., 2012; PIETERSE et al., 2014; RAIS et al., 2017; VANITHA; NIRANJANA; UMESHA, 2009; YADAV; SINGH; KUMAR, 2017). No entanto, espécies arbóreas neotropicais são comumente expostas à patógenos na natureza e mesmo que não tenha havido o contato propriamente dito com o patógeno, a ISR pode ser um dos mecanismos que evoluíram junto com essas espécies vegetais, de modo a permitir o incremento do sistema de defesa “pré” ataque.

Dentre as enzimas relacionadas com a defesa vegetal está a PAL, enzima responsável por catalisar a conversão de L-fenilalanina em diversos compostos aromáticos, denominados como (poli) fenólicos (ZHANG; LIU, 2015). Tem-se também a PPO, enzima que está localizada nos cloroplastos e é responsável por oxidar compostos fenólicos em quinonas sendo que o acúmulo de quinonas reduz o valor nutricional do tecido reduzindo assim a herbivoria (BOECKX et al., 2015). Desse modo, ambas as enzimas estão envolvidas no desencadeamento da ISR por meio da inoculação com BPCP e atuam na proteção de plantas contra estresses bióticos e abióticos (DRESSEN et al., 2017; GOUDA et al., 2018; PANADARE; RATHOD, 2018).

As BPCP comumente são aplicadas nas sementes ou incorporadas à turfa para então serem misturadas no solo. Contudo o uso de turfa é limitado pelas variações em sua composição química e física. Além disso, a origem da turfa a partir de material não renovável, justifica a utilização de metodologias que minimizem o dano ao meio ambiente para inoculação das bactérias (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Uma alternativa que pode reduzir os danos ao meio ambiente é a aplicação das BPCP por meio de soluções contendo bactérias vivas, metodologia amplamente utilizada pela facilidade de manejo em campo e possibilidade de adição de nutrientes que auxiliem na manutenção das bactérias (BASHAN et al., 2014).

Na ausência de fertilização nitrogenada, a produtividade do milho IAC 125 em campo aumentou cerca de 30 % quando as sementes foram inoculadas com  $10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC)  $\text{mL}^{-1}$  de *A. brasilense* (Ab-V5), em relação

ao não inoculado (SPOLAOR et al., 2016). Ainda, a aplicação de solução contendo  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de diferentes espécies de BPCP reduziu os danos causados pelo déficit hídrico em mudas de *Trema micranta* e *Cariniana estrellensis*, por meio da manutenção da atividade de enzimas presentes no ciclo de assimilação do carbono, desenvolvimento mais eficiente de raízes e proteção contra o estresse oxidativo (TIEPO et al., 2018).

Um estudo realizado com sementes de *Cecropia pachystachya* inoculadas com *Methylobacterium komagatae* (ZM) e Ab-V5 e tratadas com nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) mostrou que a inoculação com Ab-V5 proporcionou aumento na biomassa de raízes e parte aérea e aumento na área foliar total. Já a inoculação com ZM aumentou a concentração de amônio, aminoácidos, açúcares solúveis totais e proteínas nas raízes (CALZAVARA et al., 2016). A inoculação com BPCP ainda aumentou a porcentagem de germinação de sementes de *Cecropia pachystachya* (Ab-V5 87,5 %, ZM 78 %) quando comparadas ao tratamento não inoculado (27 %), assim como o índice de vigor dessa espécie (dados não publicados). Contudo, os estudos envolvendo a associação entre BPCP e espécies arbóreas neotropicais foram conduzidos em ambientes com condições controladas, como casas de vegetação, de modo que o potencial dessas bactérias associativas em viveiros é desconhecido.

Sendo assim, é necessário explorar a associação de mudas com as BPCP em viveiros já que esses microrganismos podem auxiliar na obtenção de mudas com melhor qualidade e mais aclimatadas a condições adversas, com o objetivo de aumentar a eficiência dos programas de reflorestamento por meio da redução na mortalidade das mudas.

## **2. OBJETIVO**

Analisar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) no desenvolvimento de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze mantidas na sombra e em sol pleno, a partir de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de crescimento capazes de indicar interferência dessa associação na qualidade de mudas cultivadas em viveiros.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Nas mudas inoculadas com Ab-V5 e ZK:

- I. Analisar alterações no processo fotossintético nas mudas mantidas na sombra e em sol pleno;
- II. Avaliar a influência das BPCP nos mecanismos de defesa das mudas em dois níveis de luminosidade;
- III. Analisar o crescimento e o desenvolvimento das mudas cultivadas na sombra e no sol pleno.

### **3. HIPÓTESES**

- I. A interação entre BPCP e mudas de *C. estrellensis* promove alterações morfo-fisiológicas que favorecem qualidade das mudas em viveiros;
- II. Mudas inoculadas e mantidas em sol pleno apresentam maior qualidade com melhor aclimação a condições adversas como, alta luminosidade e temperatura, em relação às mudas inoculadas na sombra.
- III. Mudas de *C. estrellensis* associadas às BPCP apresentam aumento na atividade de enzimas que podem indicar indução de resistência sistêmica contribuindo para os mecanismos de defesa vegetal.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E MATERIAL VEGETAL**

O experimento foi realizado no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina no município de Londrina, PR.

Foi utilizada a espécie arbórea neotropical que já é utilizada em programas de reflorestamento da Mata Atlântica, *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze – Família Lecythidaceae, sendo ela uma espécie heliófila ou de luz difusa que tolera o sombreamento na fase juvenil, além de ser típica dos estágios sucessionais avançados (Fig. 1).



**Figura 1** - Exemplar de *Cariniana estrellensis* com as sementes.

Adaptado de : <https://www.arvores.brasil.nom.br/new/jequitiba/index.htm>

Esta espécie ocorre no Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru sendo encontrada principalmente na floresta pluvial atlântica e subtropical na costa do Brasil. Contudo, pode ser encontrada também em florestas secas no interior de Minas Gerais e São Paulo ou em florestas de galeria do Brasil Central (LEITE, 2007).

Popularmente *C. estrellensis* é conhecida como jequitibá ou jequitibá-branco e suas folhas são ovais com nervuras aparentes, apresentam tamanhos médios de 6-12 cm de comprimento por 3-6 cm de largura e caem total ou parcialmente no inverno (LORENZI, 2016). As sementes de *C. estrellensis* são classificadas como recalcitrantes, isto é, são intolerantes à dessecação e temperaturas baixas e apresentam curta longevidade. Além disso, as sementes não apresentam dormência e usualmente são dispersas pelo vento (LEITE, 2007).

## 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a montagem do experimento foram utilizados os inóculos de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK), provenientes da coleção de bactérias promotoras do crescimento em plantas da Universidade Estadual de Londrina (CBPCV-UEL). A seleção das duas estirpes bacterianas foi feita a partir dos resultados relacionados ao processo fotossintético e de crescimento obtidos em experimentos realizados em casa de vegetação com espécies arbóreas neotropicais (TIEPO et al., 2018). Os inóculos foram preparados a partir de culturas puras

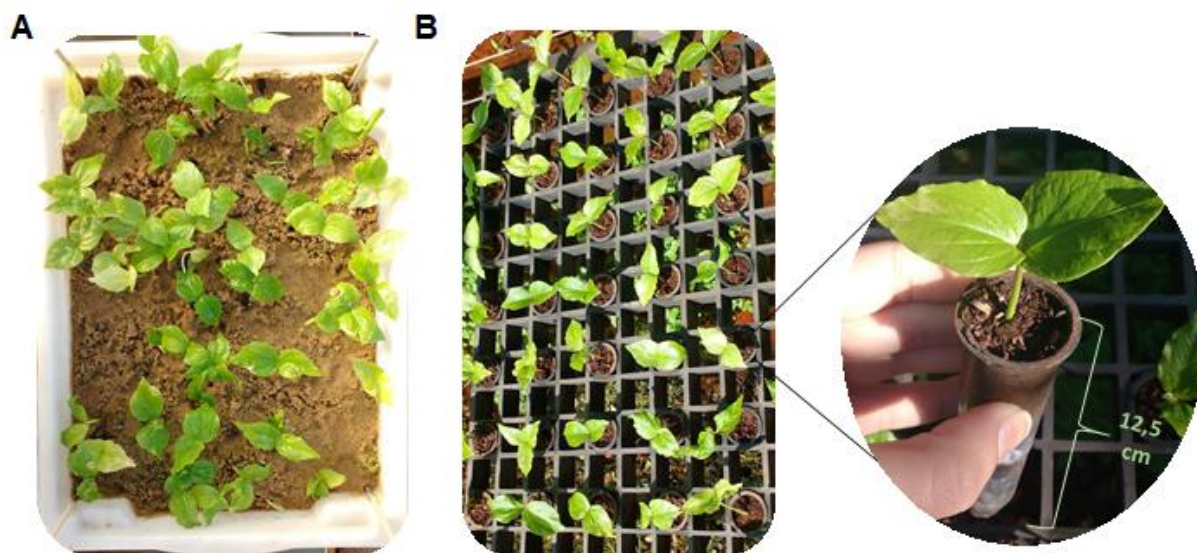
fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL.

Alíquotas provenientes das culturas puras foram transferidas para meio líquido DYGS ( $\text{g L}^{-1}$ , glicose, 2,0; ácido málico, 2,0; extrato de levedura, 2,0; ácido glutâmico, 1,5; peptona, 1,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5) e mantidas em agitador orbital a 180 RPM e 28 °C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota desse pré-inóculo foi transferida para o meio líquido de cultivo chamado MCA4, sendo esse meio preparado com baixa razão C:N e com quantidades definidas de glicerol (46,6 %), sacarose (23,3 %), extrato de levedura (23,3 %), goma xantana (0,47 %), polivinilpirrolidona (0,47 %), minerais ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , Fe-EDTA) e micronutrientes (Mo, Mn, B, Cu, Zn). As culturas de bactérias foram crescidas em Erlenmeyer (250 mL volume) contendo 50 mL do meio de cultivo que foram mantidos em agitadores orbitais a 180 RPM e 28 °C por 48 horas. Ao final desse período, os cultivos foram interrompidos sendo a concentração de células estimada por absorbância ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ) e a contagem pela técnica de unidades formadoras de colônias (UFC) para a normalização da concentração de células nos inoculantes para cerca de  $1 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (MARCELINO et al., 2016).

As sementes de *C. estrellensis* utilizadas nesse estudo foram compradas da empresa Sementes Caiçara Ltda® em Brejo Alegre/SP e semeadas em três bandejas plásticas de 7 L contendo areia previamente esterilizada. Logo após a semeadura, uma bandeja foi regada com água configurando o tratamento não inoculado (N.in), outra regada com 500 mL do inóculo de Ab-V5 e a terceira bandeja regada com 500 mL do inóculo de ZK sendo  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$  a concentração de cada inóculo (Fig. 2A). As sementes regadas com água, Ab-V5 e ZK receberam o mesmo tratamento ao serem transplantadas para os tubetes e no momento em que foram transferidas para o setor de rustificação. Após a germinação, foi feita uma triagem para selecionar as plântulas mais semelhantes entre si, a fim de iniciar o experimento com mudas que apresentassem o mesmo padrão de tamanho.

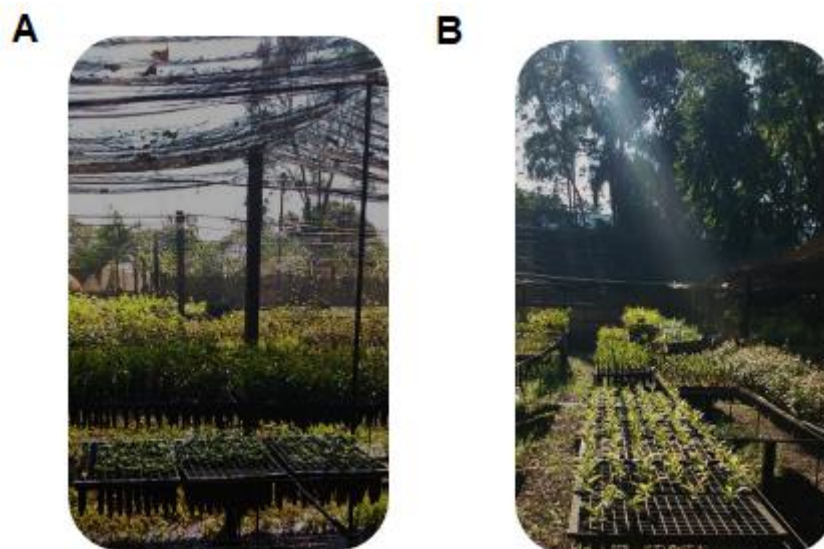
Realizou-se então o transplante de uma planta por tubete cônico de polietileno de alta densidade com 2,65 cm de diâmetro interno, 12,5 cm de altura e 50  $\text{cm}^3$  de volume total. No dia do transplante foi adicionado ao substrato 2,5 mL (volume definido previamente para que não houvesse extravasamento do tubete) da suspensão líquida que continha  $10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$  dos inóculos utilizados em cada tratamento e mudas do tratamento N.in foram regadas com água (Fig. 2B). O substrato

utilizado para preencher os tubetes continha compostos vegetais e areia, além do adubo de liberação controlada Osmocote® (14 % de nitrogênio, 14 % de potássio e 14 % de fósforo).



**Figura 2 - A:** Sementes germinadas em bandeja com areia; **B:** Plântulas transplantadas para tubetes.

As mudas foram mantidas no setor de crescimento (denominado sombra, Sb) por 40 dias (Fig. 3A), sendo esse o período necessário para que as três primeiras folhas estivessem completamente expandidas. Após esse período, houve nova adição de 2,5 mL dos inóculos na concentração  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, de acordo com o tratamento realizado na germinação, e mudas N.in foram irrigadas com água. Aproximadamente 50 % das mudas foram transferidas para a área de aclimação (chamado de sol pleno, Sp) onde permaneceram por 40 dias (Fig. 3B) e, as mudas restantes foram mantidas no setor de crescimento até o final do experimento. Cerca de 15 dias antes da finalização do experimento foi realizada nova adição de 2,5 mL dos inóculos ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) utilizados em cada tratamento em todas as mudas mantidas na sombra e no sol pleno. As mudas cultivadas no setor de crescimento e aclimação foram irrigadas por meio de sistema automático de aspersão em quatro períodos distintos do dia com duração de 30 minutos cada.



**Figura 3** - **A**: Setor de crescimento com DFFF reduzida em relação ao sol pleno; **B**: Setor de aclimação onde as mudas foram expostas ao sol pleno.

É importante destacar que como esse foi o primeiro trabalho envolvendo associação de BPCP e uma espécie arbórea neotropical mantida em viveiro, as metodologias utilizadas foram adaptadas de metodologias usualmente utilizadas em casa de vegetação. Em um estudo realizado pelo grupo com mudas arbóreas neotropicais associadas com BPCP, em casa de vegetação, aplicou-se inóculos na concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (TIEPO et al., 2018). Contudo, devido a irrigação periódica no viveiro havia a possibilidade de lixiviação dessas bactérias, foi decidido então aplicar os inóculos 10 vezes mais concentrado ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>).

O experimento foi conduzido em esquema de subparcelas casualizadas dentro das parcelas, sendo as parcelas: sombra e sol pleno e as subparcelas: inoculações (não inoculado, N.in; inoculado com Ab-V5; e inoculado com ZK).

### 4.3 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

Ao final do experimento (80 dias) foram avaliados os parâmetros relacionados às trocas gasosas na penúltima folha completamente desenvolvida das mudas mantidas sob 40 % de DFFF e sob sol pleno. Sob uma DFFF saturante de  $1900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , definida por estudos prévios com a espécie utilizada nesse estudo (CALZAVARA et al., 2019), foi analisado: a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) e condutância estomática (*g<sub>s</sub>*). Essas medidas foram realizadas por meio de um sistema portátil de fotossíntese (LI-6400XT; LI-COR Biosciences, USA) com um analisador de gás infravermelho (IRGA) conectado a uma câmera de medição 6400-02B com uma fonte de luz LED. Foram realizadas análises no período da manhã (entre 7:00 e 9:00

horas) e ao meio dia (entre 12:00 e 14:00 horas), porém os dados da manhã não foram explicativos, de forma que nesse estudo foram utilizados apenas os dados obtidos ao meio dia. Foi determinado ainda a eficiência intrínseca no uso da água ( $EiUA$ ) dada pela razão  $A/g_s$ .

Foram construídas curvas de luz em que as folhas foram supridas com  $CO_2$  ambiente e DFFF saturante até que  $A$  e concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) se estabilizassem. Depois disso, a DFFF foi reduzida de forma escalonada (600, 300, 200, 100, 75, 50, 30, 15 e 0  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) e em cada DFFF a  $A$  foi obtida no momento em que as folhas atingiram o estado estacionário, como descrito por Calzavara et al. (2015).

Curvas de assimilação de  $CO_2$  em resposta a  $C_i$  foram construídas com 1900  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$  de DFFF e 400  $\mu mol mol^{-1}$  de  $CO_2$  como valor de referência inicial. Os valores de referência de  $CO_2$  foram alterados para: 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500 e 1900  $\mu mol mol^{-1}$  e em cada valor de  $CO_2$  foi determinada  $A$  após atingir-se o estado estacionário. A taxa fotossintética líquida saturada de  $CO_2$  ( $A_{sat CO_2}$ ) foi determinada a partir das curvas ajustadas  $A-C_i$ , e o modelo descrito por Sharkey et al. (2007) foi utilizado para estimar a taxa máxima de carboxilação de Rubisco ( $V_{cmax}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ) e uso de trioses fosfato ( $TPU$ ).

A fluorescência da clorofila  $a$  foi determinada ao meio dia na penúltima folha completamente expandida através do fluorômetro OS1p (Opti Sciences), permitindo verificar a eficiência máxima do fotossistema II (razão  $F_v/F_m$ ) e a existência de fotoinibição, conforme Shimizu et al. (2006). As folhas foram aclimatadas ao escuro por 20 minutos com cliques específicos e a fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi medida na face adaxial da folha. Em seguida, a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi determinada após pulso de irradiância saturante de 0,8 s de 8250  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$  e a fluorescência variável ( $F_v$ ) calculada como  $F_v = F_m - F_0$  e a eficiência máxima do fotossistema II expressa por  $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ . Já a taxa relativa de transporte de elétrons ( $rETR$ ) foi calculada por  $DFFF \times \Delta F/F_m' \times 0,5 \times 0,84$  sendo  $\Delta F/F_m'$  a produtividade quântica efetiva do fotossistema II, 0,5 a fração de luz absorvida pelo complexo antena do fotossistema II e 0,84 o coeficiente médio de absorção de luz das folhas.

Curvas rápidas de luz ( $rETR \times DFFF$ ) foram realizadas na penúltima folha completamente expandida após 5 minutos de aclimação ao escuro, sendo que houve aumento gradativo na DFFF (0, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 350, 400 e 450). Em

cada DFFF foi marcada a  $rETR$  e a partir desses dados, gerado uma curva hiperbólica que foi ajustada pelo programa Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., USA) com base em uma função exponencial simples de acordo com Rascher; Liebig; Lüttge (2000) para determinar a intensidade luminosa em que o transporte de elétrons era saturado, conhecido como ponto de saturação luminoso (PSL) e velocidade máxima de transporte de elétrons ( $ETR_{max}$ ).

#### 4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

##### 4.4.1 Dosagem de Pigmentos

Para a análise de clorofilas, foi coletado 0,1 g de folha e após maceração em nitrogênio líquido foram homogeneizados em solução de acetona 80 % em tampão fosfato de sódio 2,5 mM com pH 7,8. As amostras foram centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos e a absorvância medida em três comprimentos de onda: 663,2 nm, 646,8 nm e 470 nm em espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, USA). Determinou-se o teor de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) e carotenoides (Car) da seguinte forma: Chl a =  $(12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8})$ ; Chl b =  $(21,5 \times A_{646,8} - 5,1 \times A_{663,2})$  e Car =  $(1000 \times A_{470} - 1,82 \text{Chl a} - 85,02 \text{Chl b})/198$ . Sendo  $A_{663,2}$  a absorvância a 663,2 nm,  $A_{646,8}$  a absorvância a 646,8 nm e  $A_{470}$  a absorvância a 470 nm. Também foi calculado o teor total de clorofilas (WELLBURN, 1994).

##### 4.4.2 Dosagem de Nitrogênio Foliar Total

As folhas secas (0,1 g) foram trituradas, transferidas para tubos de ensaio e submetidas à digestão com 7 mL de ácido sulfúrico concentrado com sulfato de cobre em bloco digestor (EMBRAPA, 2009). A temperatura inicial do bloco de digestão foi 100 °C com aumento de temperatura a cada 30 minutos (150, 200, 250 e 350 °C), totalizando cerca de 3 horas de digestão. A quantidade de N presente na solução ácida resultante da digestão foi determinada pelo método de Kjeldahl, no qual a solução ácida reagiu com o hidróxido de sódio 18 N (NaOH) e a amônia ( $\text{NH}_3$ ), liberada pela reação, coletada em um frasco contendo ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). A junção de  $\text{NH}_3$  com o  $\text{H}_3\text{BO}_3$  levou a formação de borato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), que foi titulado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 N de título conhecido, até que houvesse mudança na cor do indicador (azul para rósea). O nitrogênio total foi determinado pela seguinte

fórmula:

$$\% N \text{ total} = \frac{\text{amostra} - \text{branco} * 100}{0,1} * \text{Fator do titulante} * 0,0007 \text{ N}$$

O valor resultante foi multiplicado por 10 para converter a porcentagem de N total em g de N por Kg de massa seca.

#### **4.4.3 Dosagem da Atividade da Fenilalanina Amônia Liase (PAL) e Polifenol Oxidase (PPO)**

Para a determinação da atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO), cerca de 250 mg de folhas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida adicionado o tampão de extração Farnden (ditiotreitól (DTT) 10 mM, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1 % (p/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M pH 7,2 e sacarose 0,4 M) (FARNDEN; ROBERTSON, 1980). A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4 °C, coletando-se o sobrenadante que foi utilizado para as determinações enzimáticas de acordo com Alves et al. (2009) e Arruda et al. (2018) com as modificações descritas abaixo.

A atividade da PAL foi determinada em alíquotas de 50 µL do extrato vegetal que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados o tampão Farnden sem DTT e PVPP e a fenilalanina (0,01 M. L<sup>-1</sup>). Como branco foram utilizados o tampão Farnden, também sem DTT e PVPP, e a fenilalanina 0,1 (0,01 M. L<sup>-1</sup>), sendo 1,5 mL o volume final da reação e do branco. A mistura foi incubada em banho-maria a 40 °C por 60 minutos e então transferida para banho de gelo até o momento da leitura a 290 nm em espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, USA). A atividade da PAL foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 30,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados expressos em µmol fenilalanina consumida min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>.

A atividade da PPO foi determinada por meio de alíquotas de 50 µL do extrato vegetal que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados o tampão de extração e o catecol 0,1 (0,01 M. L<sup>-1</sup>), tendo como branco o tampão Farnden, sem DTT e PVPP, e o catecol (0,01 M. L<sup>-1</sup>), sendo 1,5 mL o volume final da reação e do branco. A mistura foi incubada em banho-maria a 30 °C por 30 minutos e então transferida para banho de gelo. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, USA) a 410 nm, sendo a atividade da PPO calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados expressos em µmol catecol consumido min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>.

#### 4.5 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

A área foliar total (cm<sup>2</sup>) foi medida com um integrador de área foliar portátil modelo LI-3000CAP, o diâmetro do caule logo acima do solo (mm) com paquímetro digital e o comprimento de parte aérea com régua milimetrada. Para a determinação da massa seca, foram separadas folhas, caule e raízes, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa (SP 100-150-IN, Labor, BR) a temperatura de 60 °C por 72 h até atingirem peso constante, e posteriormente tiveram a massa aferida em balança semi-analítica (D- 7470, Sauter, CH). Os dados de massa seca das folhas foram utilizados para determinar a área foliar específica por meio da razão área foliar/massa seca das folhas.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados testados para normalidade e homogeneidade das variâncias e então foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores, comparando os efeitos da luminosidade e da inoculação e quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software Sisvar 5.6* (FERREIRA, 2010).

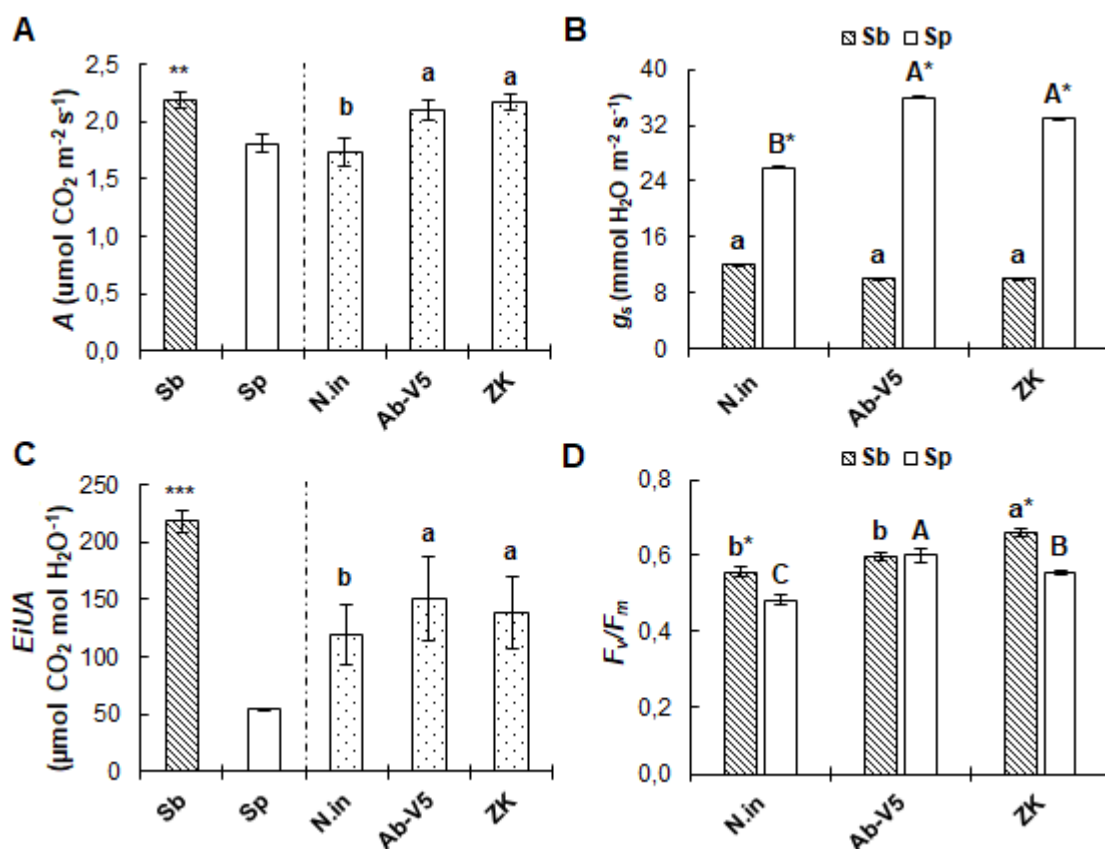
Em relação à análise dos dados, quando o fator luminosidade afetou ( $p \leq 0,05$ ) a variável resposta, os tratamentos foram denominados sombra (Sb) e sol pleno (Sp) e representaram a média de todas as mudas mantidas na sombra e sol, respectivamente. Quando o fator inoculação afetou ( $p \leq 0,05$ ) a variável resposta, os tratamentos foram denominados: não inoculado (N.in) representando uma média entre todas as mudas que receberam apenas água, Ab-V5 para a média de todas as mudas que receberam apenas o inóculo de Ab-V5 e ZK a média de todas as mudas que receberam apenas o inóculo de ZK. Nessas denominações, as médias abrangeram os dados de mudas mantidas na Sb e em Sp. Quando houve interação entre luminosidade e inoculação ( $p \leq 0,05$ ), os tratamentos foram separados em Sb e Sp e em cada luminosidade houve a distinção entre as inoculações (N.in, Ab-V5 e ZK) sendo que letras minúsculas comparavam as inoculações em Sb e letras maiúsculas comparavam as inoculações em Sp. O asterisco indicou diferença na média para a mesma inoculação entre Sb e Sp.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PROCESSO FOTOSSINTÉTICO

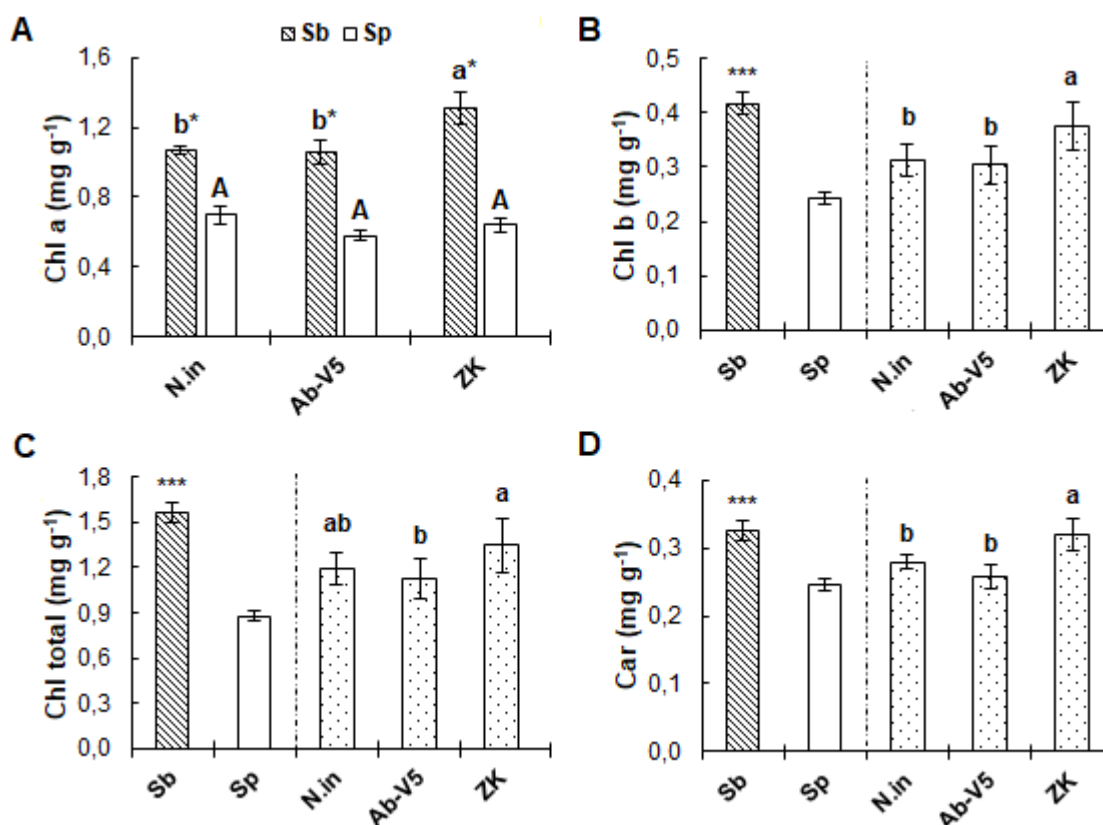
Observou-se efeito simples para luminosidade e inoculação sobre a variável assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ). Assim, mudas na sombra (Sb) apresentaram maior  $A$  em relação ao sol pleno (Sp) e a inoculação tanto com Ab-V5 quanto com ZK aumentou a  $A$  das mudas nas duas condições de luminosidades (Fig. 4A). Mudas Ab-V5 Sp e ZK Sp obtiveram maior condutância estomática ( $g_s$ ) em relação às N. in Sp e os tratamentos em Sp apresentaram maiores  $g_s$  que os respectivos tratamentos em Sb (Fig. 4B). A luminosidade e inoculação apresentaram efeito simples para a eficiência intrínseca no uso da água ( $EiUA$ ), de modo que mudas na Sb apresentaram maior  $EiUA$  que mudas em Sp e a inoculação com Ab-V5 e ZK induziu aumento na  $EiUA$  em relação às N.in nas duas condições de luminosidade (Fig. 4C).

A inoculação com ZK na Sb resultou em maior razão  $F_v/F_m$  em relação aos outros tratamentos na mesma luminosidade e, em Sp a inoculação com Ab-V5 e ZK levou a uma maior razão  $F_v/F_m$  em relação as N.in (Fig. 4D). Além disso, mudas N.in Sb e ZK Sb apresentaram maiores valores de  $F_v/F_m$  em relação aos mesmos tratamentos em Sp (Fig. 4D). O fato de que a razão  $F_v/F_m$  em Ab-V5 na Sb e em Sp não diferiu entre si, mostra que a inoculação preveniu a redução na eficiência máxima do fotossistema II, mediante a exposição ao sol (Fig. 4D).



**Figura 4** - **A**: Taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  (**A**); **B**: Condutância estomática ( $g_s$ ); **C**: Eficiência intrínseca no uso da água ( $EiUA$ ,  $A/g_s$ ); **D**: Eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **B** e **D**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos houve interação entre luminosidade e inoculação apenas para o teor de Chl a que foi maior nas mudas em Sb em relação às Sp e, maior em ZK Sb quando comparadas às outras inoculações em Sb (Fig. 5A). Para o teor de Chl b, Chl total e Car, os dois fatores influenciaram as variáveis resposta de forma isolada, assim, mudas na Sb apresentaram maior média que mudas em Sp (Fig. 5B-D). A inoculação com ZK induziu aumento no teor de Chl b e Car em relação às N.in e, para o teor de Chl total não resultou em diferença das N.in (Fig. 5B-D).



**Figura 5 - A: Clorofila a (Chl a); B: Clorofila b (Chl b); C: Clorofilas totais (Chl total); D: Carotenoides (Car)** em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) mantidas na sombra (Sb) e expostas ao sol pleno (Sp). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na Sb; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em Sp e barras pontilhadas representam a média entre Sb e Sp para mudas não inoculadas (N.in), inoculadas com Ab-V5 e ZK, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em A, letras minúsculas comparam as inoculações na Sb e letras maiúsculas comparam as inoculações em Sp. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

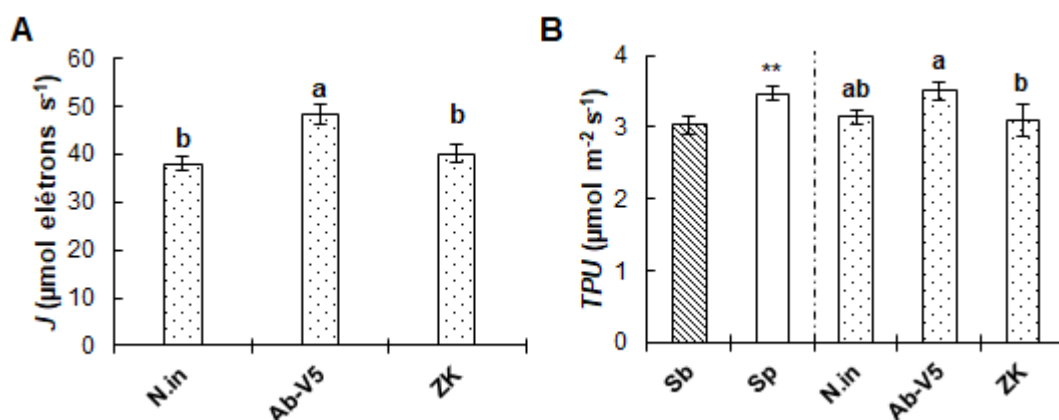
O ponto de saturação luminoso (PSL) não apresentou diferença entre as inoculações, havendo diferença apenas entre as luminosidades, com maiores valores em mudas mantidas em sol pleno em relação à sombra (Tab. 2). A inoculação com Ab-V5 em sol pleno induziu aumento na taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  em concentração saturante de  $\text{CO}_2$  ( $A_{sat}$ ) em relação às N.in em sol pleno. Além disso, mudas inoculadas com Ab-V5 e ZK em sol pleno apresentaram maiores valores para  $A_{sat}$  que as mesmas inoculações na sombra (Tab. 2). Mudas inoculadas com Ab-V5 em sol pleno apresentaram maior  $ETR_{max}$  tanto em relação às outras inoculações da mesma luminosidade, quanto em relação à Ab-V5 na sombra, assim como ZK em sol pleno apresentou maior  $ETR_{max}$  que ZK na sombra (Tab. 2). Mudas inoculadas com Ab-V5 e ZK em sol pleno apresentaram maiores valores que as respectivas inoculações na sombra sendo que, Ab-V5 e ZK nesta luminosidade apresentaram menor  $ETR_{max}$  em relação às N.in (Tab. 2). A inoculação com Ab-V5 e ZK na sombra resultou em maior

velocidade de carboxilação máxima da Rubisco ( $V_{cmax}$ ) comparadas às N.in na mesma luminosidade. No sol pleno, a  $V_{cmax}$  foi maior em ZK em relação às N.in e, em Ab-V5 embora tenha apresentado tendência ao aumento, não houve diferença em relação às N.in. Mudanças N.in e ZK em sol pleno apresentaram maior  $V_{cmax}$  que os mesmos tratamentos na sombra (Tab. 2).

**Tabela 2 - PSL:** Ponto de saturação luminoso;  $A_{sat} CO_2$ : Taxa de assimilação de  $CO_2$  em concentração saturante de  $CO_2$ ;  $ETR_{max}$ : Taxa máxima de transporte de elétrons do fotossistema II;  $V_{cmax}$ : Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK), mantidas na sombra e sob sol pleno. Os valores são as médias  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas comparam as inoculações na sombra e letras maiúsculas comparam as inoculações sob sol pleno. Letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). O asterisco indica diferença entre as médias para a mesma inoculação entre sombra e sol pleno. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Variável	Tratamento	Sombra	Sol pleno
<b>PSL</b> ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	<b>Médias</b>	146,54	300,77***
<b><math>A_{sat} CO_2</math></b> ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	<b>N.in</b>	7,06 $\pm$ 0,64 a	7,33 $\pm$ 0,22 B
	<b>Ab-V5</b>	5,70 $\pm$ 0,36 a	9,51 $\pm$ 0,44 A*
	<b>ZK</b>	6,04 $\pm$ 0,21 a	8,06 $\pm$ 0,37 AB*
<b><math>ETR_{max}</math></b> ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	<b>N.in</b>	29,68 $\pm$ 1,44 a	26,33 $\pm$ 0,48 B
	<b>Ab-V5</b>	22,99 $\pm$ 1,64 b	33,84 $\pm$ 1,02 A*
	<b>ZK</b>	18,25 $\pm$ 0,78 c	24,81 $\pm$ 1,38 B*
<b><math>V_{cmax}</math></b> ( $\mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	<b>N.in</b>	31,04 $\pm$ 2,67 b	42,25 $\pm$ 3,82 B*
	<b>Ab-V5</b>	53,52 $\pm$ 4,47 a	48,82 $\pm$ 3,54 AB
	<b>ZK</b>	44,00 $\pm$ 3,46 a	57,43 $\pm$ 2,83 A*

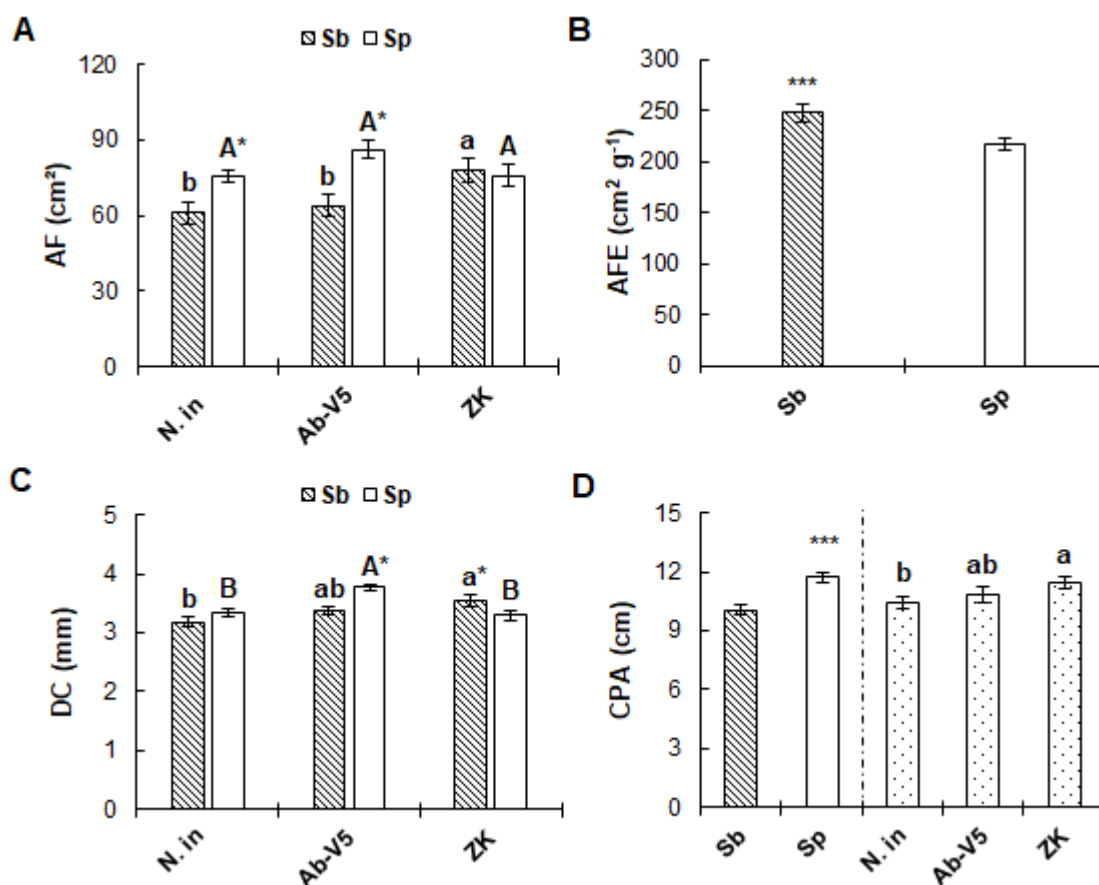
A taxa de transporte de elétrons destinados à regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) ( $J$ ) não apresentou diferença entre as luminosidades e mudas inoculadas com Ab-V5 apresentaram maior  $J$  que mudas N.in (Fig. 6A). Em relação ao uso das trioses fosfato ( $TPU$ ), mudas mantidas em Sp apresentaram maior média que mudas em Sb e em Ab-V5 foi maior que em ZK. Mudanças inoculadas com Ab-V5, embora tenham apresentado tendência ao aumento não diferiram das N.in (Fig. 6B).



**Figura 6 - A:** Taxa de transporte de elétrons ( $J$ ); **B:** Uso das trioses fosfato ( $TPU$ ) de mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. \*\* =  $p \leq 0,01$ .

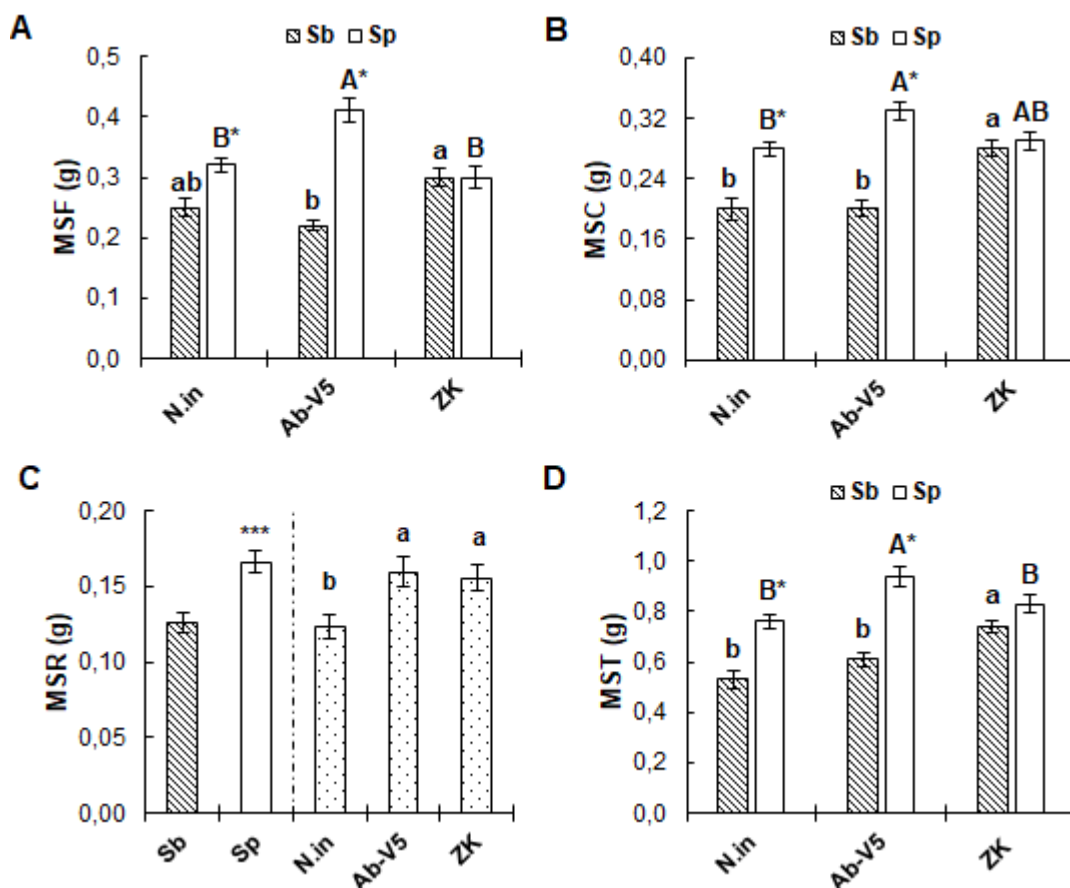
## 5.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

Mudas de ZK Sb apresentaram aumento na área foliar (AF) quando comparadas às N.in Sb e mudas N.in Sp e Ab-V5 Sp apresentaram maiores valores que os mesmos tratamentos na Sb (Fig. 7A). A área foliar específica (AFE) foi maior nas mudas mantidas na Sb em relação às de Sp e não diferiu entre as inoculações (Fig. 7B). O diâmetro do caule (DC) foi maior em Ab-V5 Sp em relação às N.in Sp e, em Ab-V5 Sp e N.in Sp maior que os respectivos tratamentos em Sb. Mudas ZK Sb apresentaram maior DC que o mesmo tratamento em Sp e que mudas N.in Sb (Fig. 7C). O comprimento da parte aérea (CPA) foi maior nas mudas em Sp em relação à Sb e entre os tratamentos, maior em ZK quando comparadas com às N.in (Fig. 7D).



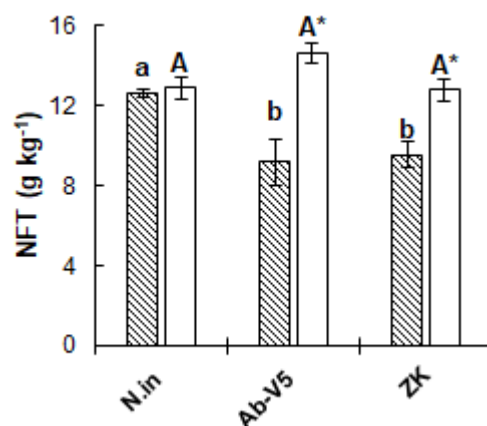
**Figura 7 - A:** Área foliar (AF); **B:** Área foliar específica (AFE); **C:** Diâmetro do caule (DC); **D:** Comprimento da parte aérea (CPA) em mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) mantidas na sombra (Sb) e em sol pleno (Sp). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na Sb; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em Sp e barras pontilhadas representam a média entre Sb e Sp para mudas não inoculadas (N.in), inoculadas com Ab-V5 e ZK, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em A e C, letras minúsculas comparam as inoculações na Sb e letras maiúsculas comparam as inoculações em Sp. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Mudas inoculadas com Ab-V5 em Sp apresentaram maiores valores que N.in Sp para massa seca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC) e massa seca total (MST). Além disso, a MSF, MSC e MST de mudas N.in Sp e Ab-V5 Sp foi maior que nos mesmos tratamentos em Sb (Fig. 8A, B e D). A massa seca da raiz (MSR) foi maior nas mudas mantidas em Sp que mudas na Sb e a inoculação com Ab-V5 e ZK induziu aumento na MSR em relação às N.in (Fig. 8C).



**Figura 8 - A:** Massa seca de folha (**MSF**); **B:** Massa seca de caule (**MSC**); **C:** Massa seca de raiz (**MSR**); **D:** Massa seca total (**MST**) de mudas de *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (**Ab-V5**) e *Bacillus* sp. (**ZK**) mantidas na sombra (**Sb**) e em sol pleno (**Sp**). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na **Sb**; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em **Sp** e barras pontilhadas representam a média entre **Sb** e **Sp** para mudas não inoculadas (**N.in**), inoculadas com **Ab-V5** e **ZK**, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e em **A**, **B** e **D**, letras minúsculas comparam as inoculações na **Sb** e letras maiúsculas comparam as inoculações em **Sp**. O asterisco está presente quando há diferença entre as médias \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

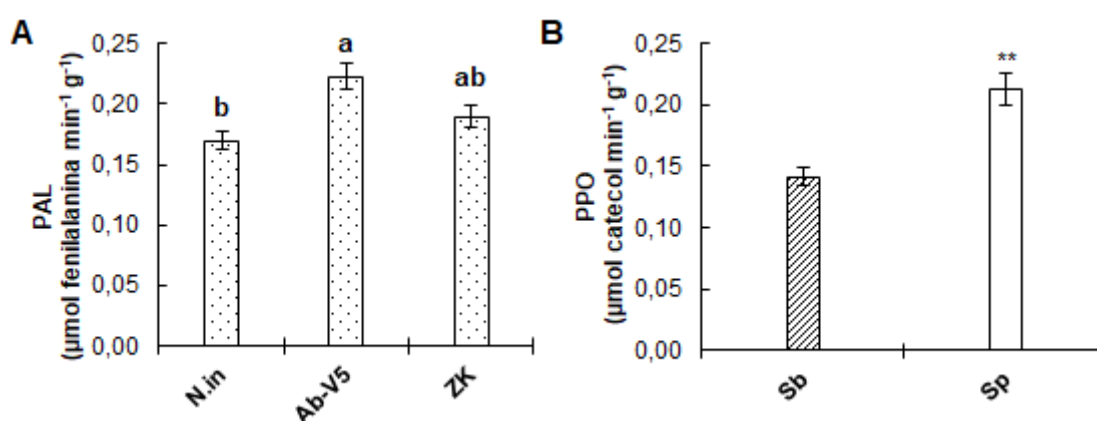
A inoculação com Ab-V5 em Sp apresentou tendência ao aumento no nitrogênio foliar total (NFT) porém não diferiu das N.in e em Ab-V5 Sb e ZK Sb o conteúdo de NFT foi menor que N.in Sb. Mudas Ab-V5 e ZK em Sp apresentaram maior conteúdo de NFT que as respectivas inoculações na Sb (Fig. 9).



**Figura 9** - Nitrogênio foliar total (NFT) em g kg<sup>-1</sup> de massa seca de mudas *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) mantidas na sombra (Sb) e em sol pleno (Sp). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na Sb; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em Sp e barras pontilhadas representam a média entre Sb e Sp para mudas não inoculadas (N.in), inoculadas com Ab-V5 e ZK, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), letras minúsculas comparam as inoculações na Sb e letras maiúsculas comparam as inoculações em Sp. O asterisco está presente quando há diferença na média para a mesma inoculação entre Sb e Sp.

### 5.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA

A inoculação com Ab-V5 induziu maior atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) em relação às N.in e não diferiu entre mudas mantidas na Sb e em Sp (Fig. 10A). A atividade da polifenol oxidase (PPO) não diferiu entre as inoculações e, em relação a luminosidade, mudas mantidas em Sp apresentaram maior atividade do que mudas mantidas na Sb (Fig. 10B).



**Figura 10 - A:** Atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL); **B:** Polifenol oxidase (PPO) em *Cariniana estrellensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus* sp. (ZK) mantidas na sombra (Sb) e em sol pleno (Sp). Barras hachuradas representam a média entre mudas mantidas na Sb; Barras sem preenchimento representam a média entre mudas mantidas em Sp e barras pontilhadas representam a média entre Sb e Sp para mudas não inoculadas (N.in), inoculadas com Ab-V5 e ZK, respectivamente. Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os traços acima das barras correspondem ao erro padrão. \*\* =  $p \leq 0,01$ .

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 PROCESSO FOTOSSINTÉTICO

A inoculação com BPCP pode auxiliar na mobilização de nutrientes como ferro e fósforo de modo a estimular direta ou indiretamente a fotossíntese (Fig. 4A), como por exemplo, por meio do aumento no teor de pigmentos visto em mudas inoculadas com ZK em relação às N.in (Fig. 5) ou por meio do aumento na  $ETR_{max}$  (Tab. 2),  $V_{cmax}$  (Tab. 3) e  $J$  (Fig. 6A) em mudas inoculadas com Ab-V5 em relação as mudas N.in (GLICK, 2012; JEYANTHI; KANIMOZHI, 2018; KUMAR; VERMA, 2018). A associação com BCPC pode facilitar também a aquisição N e com isso aumentar a produção de proteínas relacionadas ao processo fotossintético, uma vez que o N é um constituinte essencial de proteínas (LAWLOR, 2002). Além disso, o aumento na  $g_s$  em mudas inoculadas em Sp (Fig. 4B) é um indicador de que maior quantidade de  $CO_2$  foi disponibilizada para a fotossíntese (DAMOUR et al., 2010) e juntamente com a maior razão  $F_v/F_m$  (Fig. 4D), pode ter colaborado para a maior eficiência fotossintética nessas mudas (Fig. 4A).

Ainda sobre o processo fotossintético, o  $TPU$  embora não tenha diferido das mudas N.in, tendeu ao aumento em mudas inoculadas com Ab-V5 (Fig. 6B) sugerindo possível incremento na conversão das trioses fosfato em amido e sacarose, de modo que maior quantidade de  $P_i$  (fosfato inorgânico) era regenerado. O  $P_i$  é necessário para que ocorra a fosforilação de ADP em ATP na fotofosforilação, de maneira que maior quantidade de  $P_i$  favorece  $A$  (Fig. 4A) (SHARKEY; BERRY; RASCHKE, 1985; YANG et al., 2016). O aumento na síntese de amido e sacarose também influencia o crescimento das mudas, o que pode ser visto por meio do aumento no DC (Fig. 7C), MSF, MSC, MSR e MST (Fig. 8) em mudas inoculadas com Ab-V5 em sol pleno em relação às N.in na mesma luminosidade (SHARKEY; BERRY; RASCHKE, 1985; YANG et al., 2016).

A eficiência intrínseca do uso da água é definida como a razão entre a taxa líquida de assimilação de  $CO_2$  e a condutância estomática ao vapor de água e está relacionada com o controle estomático (BACON, 2009). Assim, a maior  $EiUA$  em mudas inoculadas em relação às N.in (Fig. 4C), indica que a associação com BPCP pode favorecer a regulação estomática já que, segundo De Miguel et al. (2012) o funcionamento estomático está fortemente relacionado com a  $EiUA$ . Além disso, a associação com BPCP pode influenciar na condutância mesofílica, uma vez que, de

acordo com Flexas et al. (2013), o aumento na *EiUA* geralmente está associado com o aumento da difusão de CO<sub>2</sub> do mesófilo.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, mudas mantidas na sombra apresentaram maior teor em relação às mudas mantidas em sol pleno (Fig. 5) assim como em mudas de *Caesalpinia ferrea* que cresceram sob níveis de sombreamento maiores que 40 %, sendo este um mecanismo que pode auxiliar na maximização da captura da luz (LENHARD et al., 2013). Usualmente o teor de carotenoides é maior em mudas mantidas no Sp em relação a Sb, porém nesse estudo, mudas em Sb apresentaram maior teor de carotenoides que mudas na Sp (Fig. 5D). Gama (2013) também encontrou maiores teores de carotenoides em condições de sombreamento em *Caesalpinia echinata* assim como Lichtenthaler et al. (2007) para *Acer pseudoplatanus*, *Fagus sylvatica*, *Tilia cordata* e *Abies alba*. Os Car, além de atuarem na fotoproteção dissipando o excesso de energia no ciclo das xantofilas, são importantes pigmentos acessórios que otimizam o processo de absorção de luz no comprimento azul (400-500nm), complementando a função de absorção ao longo do processo fotossintético (SCHULZE; BECK; MÜLLER-HOHENSTEIN, 2005; SENGE et al., 2014).

A inoculação não influenciou no PSL (Tab. 2) e a diferença entre mudas em Sp e na Sb pode ser associada ao fato de que mudas mantidas em Sp comumente apresentam maior  $ETR_{max}$  e maior ativação de mecanismos dissipadores de energia, como a dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor (*quenching* não-fotoquímico, NPQ) fazendo com que a intensidade luminosa necessária para que haja saturação do transporte de elétrons seja maior em Sp (Tab. 2). De modo que, ativação dos mecanismos dissipadores de energia atue como uma das estratégias que reduzem a chance de mudas aclimatadas ao sol pleno sofrerem fotoinibição (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008).

A  $A_{sat}$  CO<sub>2</sub> aumentou em mudas inoculadas com Ab-V5 no sol pleno em relação às mudas N.in possivelmente pelo fato de que a inoculação pode ter estimulado o aumento na proporção de parênquima paliçádico em relação aos outros tecidos (Tab. 2). Esse aumento no parênquima paliçádico resulta em maior quantidade de proteínas relacionadas ao processo fotossintético, como por exemplo a Rubisco, de modo que haja influência direta sobre a  $ETR_{max}$  e  $A_{sat}$  CO<sub>2</sub> (Tab. 2) (TERASHIMA et al., 2006). O fato de que mudas N.in no sol pleno não diferiram das mudas N.in na sombra e mudas inoculadas no sol pleno apresentaram maior  $ETR_{max}$  que os mesmos

tratamentos na sombra, corroboram o hipótese de aumento no parênquima paliçádico o que resultaria em maior quantidade de proteínas envolvidas no transporte fotossintético de elétrons e conseqüentemente, maior  $ETR_{max}$  (Tab. 2) (TERASHIMA et al., 2006). Ainda sobre a  $ETR_{max}$ , embora em mudas inoculadas na sombra tenha sido menor que nas mudas N.in (Tab. 2) não houve redução na  $A$  (Fig. 4A), sugerindo que a inoculação pode ter influenciado no direcionamento dos elétrons de modo a manter a atividade da Rubisco, mesmo com menor quantidade de elétrons, além de evitar o acúmulo destes que pode ser prejudicial ao processo fotossintético.

## 6.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

O aumento na área foliar em mudas inoculadas com ZK na sombra em relação às N.in (Fig. 7A) foi encontrado também em *Amarantus hypochondriacus* uma vez que, a inoculação com BPCP induziu aumento na área foliar em relação ao N.in tanto em solos inférteis como em solos férteis (PARRA-COTA et al., 2014). Assim, é possível constatar que a inoculação com BPCP pode auxiliar o desenvolvimento vegetal tanto em condições favoráveis quanto em condições desfavoráveis. As mudas mantidas na sombra apresentaram maiores valores de AFE (Fig. 7B) assim como em arbustos da espécie *Cistus salvifolius* L. mantidos em dois ambientes com irradiações contrastantes (PUGLIELLI et al., 2017). Segundo Gratani (2014), o aumento na AFE em plantas mantidas na sombra atua como uma estratégia para aumentar a eficiência na captura da luz com menor investimento em biomassa. Além disso, a AFE é considerada uma medida inversa de esclerofilia, ou seja, a menor AFE em mudas Sp (Fig. 7B) indica maior esclerofilia possivelmente devido ao maior investimento em compostos estruturais e químicos tais como fibras, ligninas e compostos fenólicos, devido à alta radiação luminosa (BOERGER; WISNIEWSKI, 2003; POORTER et al. 2004) GONÇALVES-ALVIM et al., 2006)

Os benefícios da associação de BPCP com *C. estrellensis* foi visto também no DC já que mudas inoculadas com ZK na Sb e Ab-V5 em Sp (Fig. 7C) apresentaram maior DC que mudas N.in. Giassi; Kiritani; Kupper (2016) ao estudarem a influência da associação de *Bacillus* spp. e porta-enxertos de *Citrus* encontraram maior valores para mudas inoculadas em relação as mudas não inoculadas. Mudas de pimenta (*Capsicum annuum*) inoculadas com estirpes de *Bacillus* apresentaram aumento no DC entre 7,0-20,5% em relação às plantas que não foram inoculadas (MIRIK; AYSAN; ÇINAR, 2008). Mudas com maior diâmetro de caule geralmente

possuem maior quantidade de nutrientes e carboidratos armazenados, que são prontamente disponibilizados para suprir a demanda das plantas até que o contato entre raiz e solo seja reestabelecido (GROSSNICKLE, 2012; HAASE, 2008; JACOBS; SALIFU; SEIFERT, 2005).

Chandra et al. (2018) observaram aumento na massa seca da parte aérea e das raízes em milho inoculado com BPCP em relação às não inoculadas, tanto em plantas sob estresse hídrico quanto em plantas não estressadas. Na literatura, diversos estudos que abordam a influência da associação de plantas com BPCP envolvem espécies cultivadas (FERREIRA et al., 2018; HABIB et al., 2016; NAILI et al., 2017; SINGH et al., 2017; TIMMUSK et al., 2017; VAISHNAV et al., 2015), de modo que a melhoria na aquisição de nutrientes pode ser vista pelo aumento da produtividade, como o incremento entre 7,4 e 15,4% na produtividade de milho inoculado com *A. brasilense* (LANA et al., 2012).

Já a redução no NFT em mudas inoculadas em relação às N.in na sombra (Fig. 9) foi diferente do esperado visto o aumento promovido pela associação com Ab-V5 Sp, porém essa redução pode ter contribuído para a não alteração no teor de pigmentos dessas plantas. Mudas inoculadas com Ab-V5 em sol pleno apresentaram tendência ao aumento (Fig. 9) porém não diferiram das N.in, sendo que esse leve aumento pode estar diretamente relacionado ao fato de que bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de fixar o N atmosférico, aumentando a quantidade de N disponível no solo para ser utilizado pelas plantas.

### 6.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA

Mudas inoculadas com Ab-V5 apresentaram maior atividade da PAL que mudas N.in e ZK (Fig. 10A) sendo que o aumento da atividade da PAL em resposta à inoculação com BPCP tem sido relacionado com a elicitação da resistência sistêmica induzida (ISR) em várias espécies de plantas (PODILE; LAXMI, 1998; SUNAR et al., 2015; VANITHA; NIRANJANA; UMESHA, 2009). Plantas de tomate provenientes de sementes inoculadas com *Bacillus subtilis* CBR05 apresentaram aumento na atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e PAL, ambas relacionadas à defesa vegetal, em relação as sementes não inoculadas (CHANDRASEKARAN et al., 2017). A inoculação não resultou em alteração na atividade da PPO em mudas de *C. estrellensis* (Fig. 10B). Contudo, a inoculação com *B. amyloliquefaciens* em raízes de tomateiro produziu um aumento na atividade de PAL e PPO quando as plantas foram expostas

à *Ralstonia solanacearum* (agente causador da murcha bacteriana) em relação ao controle sem BPCP inoculado apenas com *R. solanacearum* (YADAV; SINGH; KUMAR, 2017). Já a maior atividade da PPO em mudas mantidas em Sp em relação às mantidas na Sb (Fig. 10B) pode estar relacionada ao fato de que em Sp, há maior acúmulo de compostos fenólicos, de modo que há maior quantidade de substrato disponível para ser oxidado por essa enzima (CARETTO et al., 2015).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação a inoculação com ZK, foram obtidos resultados significativos como o aumento na concentração de pigmentos e na assimilação de CO<sub>2</sub>. Já a inoculação com Ab-V5 resultou em otimização do processo fotossintético, melhoria nos parâmetros de crescimento bem como possível indução de resistência sistêmica, evidenciada pelo aumento na atividade da PAL. Assim, é possível concluir que a inoculação com Ab-V5 em sol pleno é a melhor forma de cultivar *C. estrellensis* por resultar em mudas mais aclimatadas às condições adversas e que apresentam maiores chances de sobreviverem quando forem transplantadas para o campo, reduzindo assim a necessidade de replantio de mudas.

Este trabalho foi o primeiro a estudar a influencia da associação de BPCP com uma espécie arbórea neotropical mantida em viveiro, de modo que as metodologias empregadas servem como uma base para a realização de futuros trabalhos com outras espécies arbóreas neotropicais cultivadas em viveiro.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. W.; ZARTER, C. R.; MUEH, K. E.; AMIARD, V.; DEMMIG-ADAMS, B. Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. **Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment**, p. 49–64, 2006.
- ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 1–12, 2009.
- ALMEIDA, D. S. **Recuperação Ambiental da Mata Atlântica**. 3. ed. Ilhéus: EDITUS, 2016. 200 p. Disponível em: <<http://static.scielo.org/scielobooks/8xvf4/pdf/almeida-9788574554402.pdf>>.
- ALVES, A. O.; ANDRADE, G. R.; MEDEIROS, D. B.; XAVIER, A. S.; NETO, E. B.; BARRETO, L. P. Atividade da fenilalanina amônia- liase em aceroleiras submetidas ao estresse hídrico. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 6., 2009, Recife. **Anais...** 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0122-1.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2018.
- ARRUDA, I. M.; MODA-CIRINO, V.; KOLTUN, A.; SANTOS, O. J. A. P.; STOLF-MOREIRA, R.; MOREIRA, A. F. P.; GONÇALVES, L. S. A. Physiological, biochemical and morphoagronomic characterization of drought-tolerant and drought-sensitive bean genotypes under water stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 6, p. 1059-1067, 2018.
- BACON, M. A. (Org.). **Water use efficiency in plant biology**. New York: John Wiley & Sons, 2009. 344 p.
- BAEZ-ROGELIO, A.; MORALES-GARCÍA, Y. E.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; MUÑOZ-ROJAS, J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19–21, 2017.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.
- BOECKX, T.; WINTERS, A. L.; WEBB, K. J.; KINGSTON-SMITH, A. H. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3571–3579, 2015.
- BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER, E.; THEMAAT, L. VAN; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

CALZAVARA, A. K.; BIANCHINI, E.; MAZZANATTI, T.; OLIVEIRA, H. C.; STOLF-MOREIRA, R.; PIMENTA, J. A. Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 597–608, 2015.

CALZAVARA, A. K.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, H. C.; STOLF-MOREIRA, R. Photosynthetic light-response curves of light-demanding and shade-tolerant seedlings of neotropical tree species. **Photosynthetica**, 2019 (*in press*).

CALZAVARA, A. K.; PAIVA, P. H. G.; GABRIEL, L. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H. C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; DIAS-PEREIRA, J.; STOLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 4247, p. 1–2, 2018.

CALZAVARA, A. K.; ROCHA, J. S.; LOURENÇO, G.; SANADA, K.; MEDRI, C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H. C. Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development. **Plant Biology**, v. 19, n. 5, p. 720–727, 2017.

CALZAVARA, A. K.; STOLF-MOREIRA, R.; HERTEL, M. F.; DEBIASI, T. V.; MILANI, K. M. L.; CAVALHEIRO, A. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; OLIVEIRA, H. C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A. Physiology and development of a tree species under inoculation with *Methylobacterium komagatae* and *Azospirillum brasilense*. In: RELAR - REUNIÃO LATINOAMERICANA DE RIZOBIOLOGIA, 27., 2016, Londrina. **Anais...** Curitiba: NEPAR, 2016. p. 214. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1046009/1/analSRELAR2016online.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

CARETTO, S.; LINSALATA, V.; COLELLA, G.; MITA, G.; LATTANZIO, V. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26378–26394, 2015.

CHANDRA, D.; SRIVASTAVA, R.; GLICK, B. R.; SHARMA, A. K. Drought-tolerant *Pseudomonas* spp. improve the growth performance of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) under non-stressed and drought-stressed conditions. **Pedosphere**, v. 28, n. 2, p. 227–240, 2018.

CHANDRASEKARAN, M.; BELACHEW, S. T.; YOON, E.; CHUN, S. C. Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 83, n. 1, p. 7–13, 2017.

CHOUDHARY, D. K.; KASOTIA, A.; JAIN, S.; VAISHNAV, A.; KUMARI, S.; SHARMA, K. P.; VARMA, A. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants

under abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 1, p. 276–300, 2016.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 289–297, 2007.

CRAVEN, D.; DENT, D.; BRADEN, D.; ASHTON, M. S.; BERLYN, G. P.; HALL, J. S. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. **Forest Ecology and Management**, v. 261, n. 10, p. 1643–1653, 2011.

DALDEGAN, J.; SAMBUICHI, R. H. R. **Programa de aquisição de sementes e mudas nativas (PASEM): uma proposta de política pública para fins de regularização ambiental no Brasil**. Rio de Janeiro: IPEA, 2017. (Texto para discussão) Disponível em:

<[http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td\\_2272.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_2272.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

DAMOUR, G.; SIMONNEAU, T.; COCHARD, H.; URBAN, L. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 9, p. 1419–1438, 2010.

DE MIGUEL, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; CERVERA, M. T.; ARANDA, I. Functional and genetic characterization of gas exchange and intrinsic water use efficiency in a full-sib family of *Pinus pinaster* Ait. in response to drought. **Tree Physiology**, v. 32, n. 1, p. 94–103, 2012.

DERKS, A.; SCHAVEN, K.; BRUCE, D. Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1847, n. 4–5, p. 468–485, 2015.

DRESSEN, A.; HILBERATH, T.; MACKFELD, U.; BILLMEIER, A.; RUDAT, J.; POHL, M. Phenylalanine ammonia lyase from *Arabidopsis thaliana*: a potent enzyme for the synthesis of non-canonical aromatic alpha-amino acids - Comparative characterization to the enzymes from *Petroselinum crispum* and *Rhodosporidium toruloi*. **Journal of Biotechnology**, v. 258, p. 148–157, 2017.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**.

Embrapa Informação Tecnológica, 2. ed., 2009. 627 p. Disponível em:

<[http://livraria.sct.embrapa.br/liv\\_resumos/pdf/00083136.pdf](http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00083136.pdf)>

FARN DEN, K. J. F.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, J. F. (Org.). **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. Chichester, John Wiley & Sons, 1980. p. 265–314.

FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S.; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. **Planta**, v. 149, n. 1, p. 78–90, 1980.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1184–1190, 2009.

FERREIRA, D. F. Sistema de análises estatísticas -Sisvar 5.6. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010.

FERREIRA, L. V. M; CARVALHO, F; ANDRADE, J. F. C; MOREIRA, F. M. S. Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 75, n. 6, p. 461-469, 2018. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162018000600461&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162018000600461&lng=en&nrm=iso)>. access on 28 Jan. 2019.

FLEXAS, J.; NIINEMETS, Ü.; GALLÉ, A.; BARBOUR, M. M.; CENTRITTO, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; DOUTHE, C.; GALMÉS, J.; RIBAS-CARBO, M.; RODRIGUEZ, P. L.; ROSSELLÓ, F.; SOOLANAYAKANAHALLY, R.; TOMAS, M.; WRIGHT, I. J.; FARQUHAR, G. D.; MEDRANO, H. Diffusional conductances to CO<sub>2</sub> as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 45–59, 2013.

FREITAS, S. R.; HAWBAKER, T. J.; METZGER, J. P. Effects of roads, topography, and land use on forest cover dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 3, p. 410–417, 2010.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2016-2017**. São Paulo, 2018. 63 p. Disponível em: <[http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/Atlas\\_Mata\\_Atlantica\\_2016-2017\\_relatorio\\_tecnico\\_2018\\_final.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/Atlas_Mata_Atlantica_2016-2017_relatorio_tecnico_2018_final.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

GALAVIZ, C.; LOPEZ, B. R.; DE-BASHAN, L. E.; HIRSCH, A. M.; MAYMON, M.; BASHAN, Y. Root growth improvement of mesquite seedlings and bacterial rhizosphere and soil community changes are induced by inoculation with plant growth-promoting bacteria and promote restoration of eroded desert soil. **Land Degradation and Development**, v. 29, n. 5, p. 1453–1466, 2018.

GAMA, V. N. **Análises morfofisiológicas de plantas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em sol pleno e em sombreamento natural**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.ufes.br/handle/10/10004>>. Acesso em: 30 out. 2018.

GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K. C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. **Microbiological Research**, v. 190, p. 46–54, 2016.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GOES, K. C. G. P.; FISHER, M. L. C.; CATTELAN, A. J.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, C. G. P.; OLIVEIRA, A. L. M. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 437–447, 2012.

GONÇALVES-ALVIM, S. J.; KORNDORF, G; FERNANDES, G. W. Sclerophylly in *Qualea parviflora* (Vochysiaceae): influence of herbivory, mineral nutrients, and water status. **Plant Ecology**, v. 187, n. 2, p. 153-162, 2006.

GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, n. Aug., p. 131–140, 2018.

GRATANI, L. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais. **Circular Técnica Embrapa Florestas**, v. 47, n. 1, p. 1–8, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circtec47.pdf>>.

GROSSNICKLE, S. C. Why seedlings survive: influence of plant attributes. **New Forests**, v. 43, n. 5–6, p. 711–738, 2012.

GUARIGUATA, M. R.; OSTERTAG, R. Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. **Forest Ecology and Management**, v. 148, n. 1–3, p. 185–206, 2001.

GUIDI, L; TATTINI, M; LANDI, M. **Chlorophyll**: how does chloroplast protect chlorophyll against excessive light. 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/chlorophyll/how-does-chloroplast-protect-chlorophyll-against-excessive-light->>. Acesso em: 30 ago. 2018

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L. S. P. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Molecular Plant**, v. 8, n. 9, p. 1304–1320, 2015.

HAAS, D.; KEEL, C.; REIMMANN, C. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1–4, p. 385–395, 2002.

HAASE, D. Understanding forest seedling quality: measurements and interpretation. **Tree Planters' Notes**, v. 52, n. 2, p. 24–30, 2008.

HABIB, S. H.; KAUSAR, H.; SAUD, H. M.; ISMAIL, M. R.; OTHMAN, R. Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 1, p. 184-191, 2016.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Documentos, 325). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29560/1/DOC325.2011.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial**

**para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Documentos, 283). Disponível em: <  
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/468512/1/Documentos283.pdf>  
>. Acesso em: 25 ago. 2018.

JACOBS, D. F.; SALIFU, K. F.; SEIFERT, J. R. Relative contribution of initial root and shoot morphology in predicting field performance of hardwood seedlings. **New Forests**, v. 30, n. 2–3, p. 235–251, 2005.

JAIN, S.; VAISHNAV, A.; KASOTIA, A.; KUMARI, S.; GAUR, R. K.; CHOUDHARY, D. K. Bacteria-induced systemic resistance and growth promotion in *Glycine max* L. Merrill upon challenge inoculation with *Fusarium oxysporum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 83, n. 4, p. 561–567, 2013.

JEYANTHI, V.; KANIMOZHI, S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) - Prospective and mechanisms: a review. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 733–749, 2018.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? **Microbiological Research**, v. 207, n. Nov., p. 41–52, 2018.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiology and Ecology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2008. 605 p.

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399–405, 2012.

LAWLOR, D. W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: Mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 773–787, 2002.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) for genetic conservation in Brazil. **Research Journal of Botany**, v. 2, n. 3, p. 138–160, 2007. Disponível em:  
<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/189364>>.

LENHARD, N. R.; NETO, V. B. P.; SCALON, S. P. Q.; ALVARENGA, A. A. Crescimento de mudas de pau-ferro sob diferentes níveis de sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, p. 178–186, 2013.

LICHTENTHALER, H. K.; AČ, A.; MAREK, M. V.; KALINA, J.; URBAN, O. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 577–588, 2007.

LIMA, P. R.; HORBACH, M. A.; DRANSKI, J. A. L.; ECCO, M.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C. Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 316–326, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas neotropicais do Brasil**. 7. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2016. 384 p.

LUGTENBERG, B. J. J.; MALFANOVA, N.; KAMILOVA, F.; BERG, G. Plant growth promotion by microbes. **Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere**, v. 2, p. 559–573, 2013.

MADADKHAH, E.; LOTFI, M.; NABIPOUR, A.; RAHMANPOUR, S.; BANIHASHEMI, Z.; SHOOROOEI, M. Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 171–176, 2012.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7323–7338, 2016.

MAZZANATTI, T.; CALZAVARA, A. K.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, H. C.; STOLF-MOREIRA, R.; BIANCHINI, E. Light acclimation in nursery: morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 39, n. 1, p. 19–28, 2016.

MIRIK, M.; AYSAN, Y.; ÇINAR, Ö. Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* strains. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 32, n. 5, p. 381–390, 2008.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa (PLANAVEG)**. Brasília: MMA, 2014. Disponível em: <[www.mma.gov.br/images/arquivo/80049/Planaveg/PLANAVEG\\_20-11-14.pdf](http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80049/Planaveg/PLANAVEG_20-11-14.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2018.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa (PLANAVEG)**. Brasília: MMA, 2017. 73 p. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/images/arquivos/florestas/planaveg\\_plano\\_nacional\\_recuperao\\_vegetacao\\_neotropical.pdf](http://www.mma.gov.br/images/arquivos/florestas/planaveg_plano_nacional_recuperao_vegetacao_neotropical.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

MORENO, M.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; LOPEZ, B. R.; BASHAN, Y. Success of long-term restoration of degraded arid land using native trees planted 11 years earlier. **Plant and Soil**, v. 421, n. 1–2, p. 83–92, 2017.

NAILI, F.; NEIFAR, M.; ELHIDRI, D.; CHERIF, H.; BEJAOU, B.; AROUA, M.; BEJAOU, Z.; ABASSI, M.; MGUIZ, K.; CHOUCANE, H.; HADDA OUZARI; CHERIF, A. Optimization of the effect of PGPR-based biofertilizer on wheat growth and yield. **Biometrics & Biostatistics International Journal**, v. 7, n. 3, 2018.

NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 21, p. 8777–8796, 2014.

PANADARE, D.; RATHOD, V. K. Extraction and purification of polyphenol oxidase: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 431–437, 2018.

PARRA-COTA, F. I.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S.; MARTÍNEZ-GALLARDO, N. A.; DÉLANO-FRIER, J. P. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de Eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. 2009. 94 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/21638>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

PAZ, I. C. P.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A. M.; ROSA, O. P. P.; QUECINE, M. C.; SILVA, M. C. P.; AZEVEDO, J. L.; MATSUMURA, A. T. S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, n. Oct., p. 106–109, 2018.

PIETERSE, C. M. J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; VAN WEES, S. C. M.; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, 2014.

PODILE, A. R.; LAXMI, V. D. V. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonialyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 5–6, p. 255–259, 1998.

POORTER, L.; VAN DE PLASSCHE, M.; WILLEMS, S.; BOOT, R. G. A. Leaf traits and herbivory rates of tropical tree species differing in successional status. *Plant biology*, v. 6, n. 06, p. 746-754, 2004.

PUGLIELLI, G.; VARONE, L.; GRATANI, L.; CATONI, R. Specific leaf area variations drive acclimation of *Cistus salvifolius* in different light environments. **Photosynthetica**, v. 55, n. 1, p. 31–40, 2017.

RAIS, A.; JABEEN, Z.; SHAIR, F.; HAFEEZ, F. Y.; HASSAN, M. N. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–17, 2017.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 12, p. 1397–1405, 2000.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

RIBEIRO, V. P.; MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; MATTOS, B. B.; OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 40–46, 2018.

ROCHA, J. S.; CALZAVARA, A. K.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H. C. Nitrogen supplementation improves the high-light acclimation of *Guazuma ulmifolia* Lam. seedlings in the nursery. **Trees**, p. 1-11, 2018.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1242–1251, 2009.

RUBAN, A. V. Plants in light. **Communicative & Integrative Biology**, v. 2, n. 1, p. 50–55, 2009.

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

SCHULZE, E. D.; BECK, E-D.; MÜLLER-HOHENSTEIN, H. **Plant Ecology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. 702 p.

SENGE, M. O.; RYAN, A. A.; LETCHFORD, K. A.; MACGOWAN, S. A.; MIELKE, T. Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis. **Symmetry**, v. 6, n. 3, p. 781–843, 2014.

SHARKEY, T. D.; BERRY, J. A.; RASCHKE, K. Starch and sucrose synthesis in *Phaseolus vulgaris* as affected by light, CO<sub>2</sub> and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 77, n. 3, p. 617–620, 1985.

SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1035–1040, 2007.

SHIMIZU, M.; ISHIDA, A.; TANGE, T.; HISAYOSHI, Y. Leaf turnover and growth responses of shade-grown saplings of four Shorea rain forest species to a sudden increase in light. **Tree Physiology**, v. 26, p. 449–457, 2006.

SILVA, A. P. M.; MARQUES, H. R.; SAMBUICHI, R. H. R. **Mudanças no código florestal brasileiro: desafios para a implementação da nova lei**. 2016. 359 p.

Disponível em:

<[http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/livros/livros/160812\\_livro\\_mudancas\\_codigo\\_florestal\\_brasileiro.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/livros/livros/160812_livro_mudancas_codigo_florestal_brasileiro.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

SILVA, A. P. M.; MARQUES, H. R.; SANTOS, T. V. M. N.; TEIXEIRA, A. M. C.; SAMBUICHI, R. H. R.; LUCIANO, M. S. F. **Diagnóstico da produção de mudas florestais neotropicais no Brasil**. Brasília: IPEA, 2015. 58 p. (Relatório de pesquisa).

Disponível

em:

<[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7515/1/RP\\_Diagn%C3%B3stico\\_2015.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7515/1/RP_Diagn%C3%B3stico_2015.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

SINGH, A.; VAISH, B.; SINGH, R. P. Eco-Restoration of degraded lands through microbial biomass: an ecological engineer. **Acta Biomedica Scientia**, v. 3, n. 1, p. 133–135, 2016.

SINGH, R. K.; SINGH, P.; LI, H. B.; YANG, L. T.; LI, Y. R. Soil–Plant–Microbe Interactions: use of nitrogen-fixing bacteria for plant growth and development in sugarcane. In: **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives**. Springer, Singapore, 2017. p. 35-59.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v.75, n.1, p. 33–40, 2016.

SUNAR, K.; DEY, P.; CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 91–104, 2015.

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

TERASHIMA, I.; HANBA, Y. T.; TAZOE, Y.; VYAS, P.; YANO, S. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 343–354, 2006.

TIEPO, A. N.; HERTEL, M. F.; ROCHA, S. S.; CALZAVARA, A. K.; OLIVEIRA, A. L. M.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, H. C.; BIANCHINI, E.; STOLF-MOREIRA, R. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 130, n. Jul., p. 277–288, 2018.

TIMMUSK, S.; BEHERS, L.; MUTHONI, J.; MURAYA, A.; ARONSSON, A.-C. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. February, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00049/full>>.

VAISHNAV, A.; KUMARI, S.; JAIN, S.; VARMA, A.; CHOUDHARY, D. K. Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 539-551, 2015.

VANITHA, S. C.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of Tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 9, p. 552–557, 2009.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 48 p. (Documentos, 79).

Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/306458>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

YADAV, D. K.; SINGH, D.; KUMAR, N. Induction of defense-related enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* DSBA-11 in resistant and susceptible cultivars of tomato against bacterial wilt disease. **International Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 4, p. 172–180, 2017.

YAMORI, W.; NAGAI, T.; MAKINO, A. The rate-limiting step for CO<sub>2</sub> assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C<sub>3</sub> crop species. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 5, p. 764–777, 2011.

YANG, J. T.; PREISER, A. L.; LI, Z.; WEISE, S. E.; SHARKEY, T. D. Triose phosphate use limitation of photosynthesis: short-term and long-term effects. **Planta**, v. 243, n. 3, p. 687–698, 2016.

ZHANG, X.; LIU, C. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 17–27, 2015.

**Apêndice - Resultados da análise de variância de dois fatores (Luminosidade e Inoculação) em mudas de *Cariniana estrellensis*.**

Variável	Luminosidade		Inoculação		Luminosidade X Inoculação	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
A n=4	16,847	<b>&lt; 0,001</b>	8,561	<b>&lt; 0,001</b>	2,853	0,069
AF n=8	12,644	<b>&lt; 0,001</b>	2,718	<b>0,078</b>	5,051	<b>0,011</b>
AFE n=8	9,253	<b>0,004</b>	2,699	0,079	1,045	0,36
A <sub>sat</sub> CO <sub>2</sub> n=4	38,425	<b>&lt; 0,001</b>	1,036	0,375	9,714	<b>0,001</b>
Car n=4	44,678	<b>&lt; 0,001</b>	9,431	<b>0,001</b>	2,356	0,123
Chl a n=4	129,557	<b>&lt; 0,001</b>	4,002	<b>0,036</b>	3,873	<b>0,039</b>
Chl b n=4	79,507	<b>&lt; 0,001</b>	5,27	<b>0,015</b>	1,007	0,385
Chl total n=4	125,957	<b>&lt; 0,001</b>	4,758	<b>0,022</b>	3,116	0,069
CPA n=8	25,597	<b>&lt; 0,001</b>	3,263	<b>0,048</b>	1,938	0,157
DC n=8	2,778	0,103	8,009	<b>0,001</b>	8,924	<b>0,006</b>
EiUA n=4	1521,54	<b>&lt; 0,001</b>	8,01	<b>0,003</b>	1,84	0,187
ETR <sub>max</sub> n=4	23,108	<b>&lt; 0,001</b>	20,98	<b>&lt; 0,001</b>	18,621	<b>&lt; 0,001</b>
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> n=4	31,92	<b>&lt; 0,001</b>	29,55	<b>&lt; 0,001</b>	9,82	<b>0,001</b>
G <sub>s</sub> n=4	389,53	<b>&lt; 0,001</b>	7,484	<b>0,001</b>	12,617	<b>&lt; 0,001</b>
J n=4	1,678	0,211	12,084	<b>0,005</b>	2,851	0,084
MSC n=8	56,697	<b>&lt; 0,001</b>	6,725	<b>0,003</b>	12,211	<b>&lt; 0,001</b>
MSF N=8	50,287	<b>&lt; 0,001</b>	1,915	0,156	19,231	<b>&lt; 0,001</b>
MSR n=8	22,095	<b>&lt; 0,001</b>	7,111	<b>0,002</b>	0,996	0,378
MST n=8	69,588	<b>&lt; 0,001</b>	12,171	<b>&lt; 0,001</b>	7,21	<b>0,002</b>
NFT n=4	156,153	<b>&lt; 0,001</b>	5,1	<b>0,017</b>	35,125	<b>&lt; 0,001</b>
PAL n=4	0,211	0,652	5,27	<b>0,016</b>	0,818	0,457
PPO n=4	21,737	<b>&lt; 0,001</b>	1,306	0,295	0,405	0,673
PSL n=4	100,739	<b>&lt; 0,001</b>	2,043	0,158	0,0855	0,918
TPU n=3	13,14	<b>0,003</b>	4,656	<b>0,032</b>	3,54	<b>0,062</b>
V <sub>cm<sub>ax</sub></sub> n=4	3,352	<b>0,033</b>	11,016	<b>&lt; 0,001</b>	3,949	<b>0,04</b>

Valores significativos de *p* estão em negrito (*p* < 0,05).

A: taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; A<sub>sat</sub> CO<sub>2</sub>: taxa fotossintética líquida saturada de CO<sub>2</sub>; Car: carotenoides; Chl a: clorofila a; Chl b: clorofila b; Chl total : clorofilas totais; CPA: comprimento da parte aérea; DC: diâmetro do caule; EiUA: eficiência intrínseca no uso da água; ETR<sub>max</sub>: velocidade máxima de transporte de elétrons; F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>: eficiência máxima do fotossistema II; g<sub>s</sub>: condutância estomática; J: taxa de transporte de elétrons fotossintéticos; MSC: massa seca do caule; MSF: massa seca das folhas; MSR: massa seca de raiz; MST: massa seca total; NFT: nitrogênio foliar total; PAL: fenilalanina amônia liase; PPO: polifenol oxidase; PSL: ponto de saturação luminoso; TPU: uso de trioses fosfato; V<sub>cm<sub>ax</sub></sub>: taxa máxima de carboxilação de Rubisco.