

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

POTENCIAL DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS DE
OLIVEIRA (*Olea europaea L.*) INOCULADAS COM RIZOBACTÉRIAS

Talita de Novais Mariosa

Itajubá, agosto de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

TALITA DE NOVAIS MARIOSA

**POTENCIAL DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS DE
OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) INOCULADAS COM RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane G.P. Melloni

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Agosto de 2014
Itajubá – MG

Verso da folha de rosto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

Talita de Novais Mariosa

Potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea l.*) inoculadas com rizobactérias

Dissertação aprovada por banca examinadora em 20 de agosto de 2014, conferindo à autora o título de **Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos**.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eliane G. P. Melloni (Orientador)

Prof. Dr. Rogério Melloni (Co-orientador)

Profa. Dra. Fátima M.S. Moreira

Prof. Dr. Marcelo Chuei Matsudo

Itajubá - MG

2014

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus queridos avôs, Roberto e João Batista e à minha querida avó Lazineira, cujos afetos eu sempre levarei no meu coração (*In memoriam*).

Aos meus amados pais, Ailson e Helena, aos meus queridos irmãos, Anele e Marcelo e ao meu amor, Phelipe.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro, a Deus que sempre me guiou, colocou as pessoas e oportunidades certas em meu caminho, e por ser minha inspiração de fé e fortaleza nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, professores Dra. Eliane G. P. Melloni e Dr. Rogerio Melloni pelo apoio. Foram fundamentais para concretização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Microbiologia da UNIFEI por tornar possível a realização desse trabalho.

A FEMF-EPAMIG por mostrar interesse no trabalho e disponibilizar material e local para o experimento. Aos funcionários Milton, Luiz Fernando de Oliveira da Silva e Emerson Dias Goncalves pela colaboração e auxílio durante todo o período do experimento em campo.

Ao técnico de laboratório, Paulo Sergio Marques, por todo auxílio no laboratório, e demais técnicos da UNIFEI que colaboraram durante a execução deste trabalho.

A Jandyra Fachel e Gilberto Mesquita do Núcleo De Assessoria Estatística (Instituto De Matemática) da UFRGS, e Luiz Fernando de Oliveira da Silva, pela ajuda e conselhos na análise estatística dos dados.

Aos anjos da minha vida, meus pais, Helena e Ailson, pelo amor, amizade, apoio, incentivo, segurança e paciência que sempre me oferecem de forma incondicional. Eles são meu espelho, minha referência de ser humano que procuro ser na minha vida, e tudo que sou em educação, honestidade, determinação, humildade e integridade, deve a eles.

Aos meus queridos irmãos, Anele e Marcelo, por me ouvirem, por saberem e compreender as minhas dificuldades, e por me apoiarem sempre!

Ao meu amor, Phelipe Brito, pelo companheirismo, afeto, atenção, apoio, incentivo e paciência. Pelo seu ombro amigo em todas as vezes que preciso sempre disposto a me ouvir, compreender e ajudar.

Agradeço profundamente aos meus pais, aos meus irmãos e ao Phelipe, todas as vezes que me acompanharam e me levaram até Itajubá e Maria da Fé, ajudando na realização do meu experimento, desde as visitas rotineiras até a coleta dos resultados. Obrigada por acreditarem em mim e no meu trabalho!

Agradeço de coração a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) estão relacionadas ao desenvolvimento de plantas por meio da promoção do crescimento (por meio da solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios ou fixação de nitrogênio) e proteção contra organismos patogênicos. Este estudo objetivou avaliar o potencial de isolados de rizobactérias promoverem o enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira, na Fazenda Experimental de Maria da Fé-Epamig. As estacas provenientes de três cultivares de oliveira, Grappolo 541, Arbequina e Maria da Fé, foram submetidas à inoculação com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t), os isolados bacterianos (números 32, 39, 42 e 48), com o hormônio sintético (AIB) e a testemunha (meio líquido Dygs sem inoculação e sem AIB), sendo realizadas 10 repetições por tratamento de cada cultivar, totalizando 300 unidades experimentais. No experimento de quantificação de produção de AIA realizado em laboratório, os isolados e estirpes-tipo apresentaram produção de AIA variando de 199,8 a 1.406,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o isolado bacteriano 39 com maior produção de AIA. Após 150 dias de inoculação das estacas, os isolados bacterianos 39 e 42 apresentaram maior potencial de sobrevivência na cultivar Grapollo 541. Além disso, o isolado 39 proporcionou a maior porcentagem de estacas com calo, enquanto o isolado 42 promoveu a maior porcentagem de enraizamento, demonstrando que ambos promoveram o mesmo efeito do hormônio AIB nesta cultivar, incrementando a taxa de sobrevivência das estacas, formação de calos e enraizamento. No entanto a inoculação e o uso de AIB na cultivar Maria da Fé proporcionaram alta porcentagem média de estacas mortas, não sendo recomendados para essa cultivar. Nenhum tratamento apresentou efeito significativo em relação às variáveis em estudo da cultivar de oliveira Arbequina.

Palavras-chave: inóculo, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, fitohormônios, AIB.

ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are related to plant development by promoting growth (through solubilizing phosphates, producing phytohormones or fixing nitrogen) and protection against pathogenic organisms. This study aimed to evaluate the potential of rhizobacteria isolate to promote rooting of semi-hardwood cuttings olive in Experimental Farm of Maria da Fé-Epamig. The cuttings from the three cultivars of olive, Grappolo 541, Arbequina and Maria da Fé, were inoculated with the reference strains Azospirillum brasilense (BR 11001^t), A. amazonense (BR 11040^t), Herbaspirillum seropedicae (BR 11175^t) and Burkholderia brasiliensis (BR 11340^t), or with bacterial isolates (32, 39, 42 and 48), with the synthetic hormone (IBA) and the control (without inoculation Dygs liquid medium and without IBA), being performed 10 repetitions by treating each cultivar, totaling 300 experimental units. In the experiment to quantify the production of IAA conducted in laboratory, the bacterial isolates and the reference strains showed production of IAA ranging from 199.8 to 1406.46 mg L⁻¹, and the bacterial isolate 39 had the great production of IAA. After 150 days of cuttings inoculation, the bacterial isolates 39 and 42 had shown higher survival potential in the cultivar Grapollo 541. Besides that, the isolated 39 promoted the highest percentage of cuttings with callus, and the isolated 42 promoted higher rooting percentage, demonstrating that both promoted the same effect of the IBA hormone in this cultivar, increasing the survival rate of the cuttings, callus formation and rooting. However the inoculation and the use of IBA in cultivar Maria da Fé provided high average percentage of dead cuttings, not being recommended for this cultivar. No treatment had shown a significant effect on the variables in the olive cultivar Arbequina.

Keywords: *inoculum, plant growth-promoting rhizobacteria, phytohormones, IBA*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Crescimento das colônias em meio de cultura semi-sólido	31
Figura 2 - Determinação da densidade óptica	32
Figura 3 - Crescimento com densidade óptica ajustada	32
Figura 4 - Método colorimétrico	33
Figura 5 - Determinação da curva padrão de AIA.....	34
Figura 6 - Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial.....	34
Figura 7 - Coloração de isolados e estirpes-tipo com produção de AIA.....	35
Figura 8 - Crescimento bacteriano.....	35
Figura 9 - Preparo das diluições do inóculo	36
Figura 10 - Inoculação para avaliação da densidade do inóculo	36
Figura 11 - Crescimento e contagem de colônias.....	37
Figura 12 - Esterilização.....	38
Figura 13 - Fertilizante orgânico	39
Figura 14 - Vista geral das estacas das cultivares Arbequina e Maria da Fé	39
Figura 15 - Desinfestação das estacas	40
Figura 16 - Inoculação dos isolados bacterianos e das estirpes-tipo nas estacas	41
Figura 17 - Imersão no tratamento controle e no hormônio AIB	41
Figura 18 - Plantio das estacas	42
Figura 19 - Variáveis analisadas.....	43
Figura 20 - Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados e estirpes-tipo	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do Meio de cultura Dygs.....	32
Tabela 2 - Densidade bacteriana dos inóculos contendo isolados e estirpes-tipo.....	37
Tabela 3 - Porcentagem da média de estacas mortas, com calo e enraizadas, número médio e comprimento médio de raízes por estacas de oliveira da cultivar ‘Arbequina’ coletadas com 120 e 150 dias.....	46
Tabela 4 - Porcentagem da média de estacas mortas, com calo e enraizadas, número médio e comprimento médio de raízes por estacas de oliveira da cultivar ‘Grapollo’ coletadas com 120 e 150 dias.....	48
Tabela 5 – Porcentagem da média de estacas mortas e com calo de estacas de oliveira da cultivar ‘Maria da Fé’ coletadas com 120 e 150 dias.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 Aspectos gerais sobre oliveira (<i>Olea europea L.</i>)	16
3.2 Método de propagação em oliveira	19
3.3 Fitohormônio	20
3.3.1 Auxina.....	20
3.4 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas.....	22
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Descrição do protocolo experimental.....	29
4.2 Seleção dos isolados de rizobactérias.....	30
4.3 Teste de viabilidade dos isolados em meios de cultura específicos	30
4.4 Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico pelos isolados e estirpes-tipo	31
4.5 Crescimento individual dos isolados e das estirpes-tipo	35
4.6 Avaliação da densidade bacteriana do inóculo.....	36
4.7 Preparo do substrato (areia).....	38
4.8 Fertilizante	38
4.9 Obtenção das estacas	39
4.10 Desinfestação das estacas	40
4.11 Inoculação das bactérias nas estacas, tratamento controle e tratamento hormônio.....	40
4.12 Plantio das estacas	41
4.13 Condução do experimento	42
4.14 Variáveis analisadas	42
4.15 Análise estatística	43

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Quantificação da produção de ácido indolacético pelos isolados e estirpes-tipo	44
5.2 Avaliação do potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de RPCP	46
5.2.1 Cultivar Arbequina	46
5.2.2 Cultivar Grapollo 541	47
5.2.3 Cultivar Maria da Fé.....	51
6 CONCLUSÃO.....	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.) é praticado em várias regiões do mundo, mas a sua produção está concentrada principalmente nos países europeus, sendo à base da agricultura da região Mediterrânea da Europa (OLIVEIRA et al., 2010a). As condições climáticas mais amenas, características dos países da União Europeia, são favoráveis ao cultivo de oliveira.

No Brasil, a oliveira foi introduzida nas regiões sul e sudeste e, a partir de então, os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais apresentaram cultivo de oliveira e extração de azeite. No estado de Minas Gerais, existem plantios comerciais, especificamente na região sul, a qual apresenta épocas com índices de temperaturas baixas suficientes para a quebra de dormência das plantas, propiciando a produção de azeitonas (SILVA, 2011).

A propagação por sementes não é indicada para a produção comercial de mudas, embora as sementes dos frutos de oliveira sejam viáveis. Isto ocorre em razão das plantas provenientes da propagação por sementes serem distintas da planta-mãe e apresentarem longo período juvenil (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005; HARTMANN et al., 2002). Desta forma, a técnica mais indicada para a promoção do processo de formação de mudas, mantendo as características genéticas das plantas-matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção, é a propagação vegetativa (PASQUAL et al., 2001).

A estaquia é um método de propagação vegetativa bem disseminado na produção de mudas de oliveira, porém sua eficiência depende da capacidade de formação de raízes adventícias de cada espécie, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada (FACHINELLO HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005). Nesse sentido, o principal método de propagação da oliveira é a estaquia obtida de ramos semilenhosos (OLIVEIRA et al., 2008).

A fim de proporcionar uma melhoria no percentual de enraizamento de estacas em condições naturais, tornaram-se necessárias técnicas auxiliares, como o uso de reguladores de crescimento (MAYER, 2001). Os reguladores de crescimento podem ser compostos naturais (hormônios vegetais) ou substâncias sintéticas (hormônio sintético). E embora a auxina natural amplamente encontrada nas plantas seja o ácido indolil-3 acético (AIA), a utilização de auxinas sintéticas é muito comum na agricultura, tais como o ácido indolbutírico (AIB) que, aplicado de forma exógena no vegetal, possui ação similar a do hormônio vegetal (SIMÃO, 1998).

A manipulação do hormônio sintético AIB permite aumentar a produtividade de algumas espécies vegetais e, conseqüentemente, a obtenção de maiores lucros. Contudo, a sua aplicação pode não promover incrementos ao enraizamento (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003), pois em certas concentrações pode causar toxidez ao vegetal ou efeito inibitório do enraizamento (TOFANELLI, 1999; WENDLING; XAVIER, 2005; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

Por outro lado, a utilização de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) pode constituir uma estratégia para maximizar o processo de propagação vegetativa, uma vez que o uso destes microrganismos tem possibilitado aliar o biocontrole de fitopatogénos com a indução do enraizamento adventício e promoção do crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios (NOWAK et al., 1998; MELO et al., 2000; MELLO et al., 2002; WEBER et al., 2003; THOMAS, 2004; AYYADURAI et al., 2006; GRAVEL; ANTOUN; TWEDDEL, 2007).

Existem muitos estudos sobre o cultivo de oliveira no Brasil relacionados à produção, ao manejo e ao enraizamento de estacas de oliveira utilizando o hormônio sintético AIB (PIO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; BERTONCINI, 2012; SILVA et al., 2012; CAPELLARO, 2013) porém, em relação à utilização de microrganismos do solo na produção de oliveira no país, ainda é pouco comum. No mundo, a proibição de formulações sintéticas de reguladores de crescimento vegetal, como o AIB, na indução de enraizamento da agricultura orgânica da Comunidade Europeia, incentivou estudos sobre sistemas alternativos para melhorar a porcentagem de enraizamento natural das plantas (CENTENO; GÓMEZ-DEL-CAMPO, 2008; ERTUK et al., 2010), incluindo a inoculação de RPCP no enraizamento de oliveira (MONTERO-CALASANZ et al., 2013).

O desenvolvimento de inoculantes com RPCP pode contribuir com a agricultura sustentável, não só no âmbito de reduzir a necessidade de uso de fertilizantes e pesticidas químicos no campo (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009), devido às propriedades biofertilizantes e biopesticidas das rizobactérias (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012), mas também aliando a capacidade fitoestimuladora destes microrganismos na indução do enraizamento adventício, já que os efeitos ambientais do hormônio sintético AIB não são suficientemente conhecidos (BEYOND PESTICIDES, 2013). No presente estudo, a inoculação de rizobactérias no processo de propagação vegetativa da oliveira pode servir como uma opção alternativa natural de reguladores de crescimento na produção de mudas de oliveira, no sul de Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de isolados de rizobactérias promoverem o enraizamento de estacas de oliveira.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a produção do fitohormônio ácido indolacético (AIA) em isolados pertencentes à Reserva Biológica Serra dos Toledos (Itajubá – MG) e estirpes-tipo de rizobactérias.
- Analisar o enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira após a inoculação de rizobactérias, em condições controladas, comparando ao efeito do hormônio sintético AIB.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos gerais sobre oliveira (*Olea europaea L.*)

A oliveira, *Olea europaea L.*, pertence à família botânica *Oleaceae*, sendo a maioria das plantas desta família árvores e arbustos, e nela estão incluídos cerca de 30 gêneros (BARRANCO et al., 2004).

A espécie *Olea europaea L.* subdivide-se nas subespécies: *Olea euromediterranea oleaster* ou *Olea oleaster*, *Olea euromediterranea sativa* ou *Olea sativa*, *Olea europaea laperrini* e *Olea europaea* da subespécie *cuspidata* (SARAMAGO, 2009). Dentre estas subespécies, a *Olea euromediterranea sativa* é a oliveira cultivada e difundida na América (OLIVEIRA, 2001).

Nativa da região do Mediterrâneo, a oliveira foi uma das primeiras árvores a serem domesticadas, havendo uma longa história de seu cultivo na região mediterrânica de Valência, na Espanha, além de muitas variedades locais existentes na área (RUIZ-DOMÍNGUEZ; RAIGÓN; PROHENS, 2013). Foi originada de uma região geográfica que ocupa desde o sul do Cáucaso até as altas planícies do Irã, Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se pelo Chipre até o Egito, povoando todos os países que margeiam o Mediterrâneo (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009).

Esta espécie de oliveira é amplamente cultivada em áreas semiáridas do Mediterrâneo, onde longos períodos de déficit hídrico no solo estão normalmente presentes durante a estação seca (MELGAR et al, 2008). O clima mediterrâneo é caracterizado por apresentar elevadas temperaturas e baixo índice pluviométrico durante os meses do verão. Porém, a acumulação de frio durante o inverno do clima mediterrâneo é indispensável para que a oliveira saia da dormência e atinja florescimento uniforme (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009).

A oliveira é bem adaptada à Bacia do Mediterrâneo, caracterizando-se pela rusticidade, não exigindo solos férteis, nem regime hídrico especial (WIESMAN, 2009; BERTONCINI, 2012). Contudo, cultivos comerciais exigem solos bem aerados e férteis (BERTONCINI, 2012).

Segundo Raport (1998, p.35), a oliveira é uma árvore de porte médio, cujo sistema radicular está relacionado com a origem da árvore; se for por meio da germinação de sementes, o sistema radicular é caracterizado por uma raiz pivotante central, mas se for a partir de estacas, forma-se um sistema radicular fasciculado. Nos ramos semilenhosos, em cada nó, inserem-se duas folhas opostas, em cujo ponto de inserção encontram-se as gemas que, em função do estímulo externo que recebem, podem transformar-se em gemas

de brotação ou de florescimento. A flor é constituída por quatro sépalas verdes e por quatro pétalas brancas, as quais formam a corola. O fruto, denominado azeitona, é uma drupa de tamanho pequeno e forma elipsoidal, cujas dimensões podem apresentar entre 1 a 4 cm de comprimento e diâmetro de 0,6 a 2 cm com acumulação de azeite nas células do mesocarpo.

O processo de crescimento e amadurecimento da azeitona pode demorar cerca de 5 meses em condições climáticas normais (GHANBARI et al., 2012), sendo o tamanho dos frutos, na sua globalidade, influenciado por diversos fatores, como a disponibilidade de água, a temperatura ou as diferenças genéticas entre as cultivares (HAMMAMI; MANRIQUE; RAPOPORT, 2011).

A azeitona não pode ser consumida na sua forma natural devido ao seu amargor, resultante, principalmente, da elevada concentração de oleuropeína (BOURQUELOT; VENTILESCO, 1908; PANIZZI; SCARPATI; ORIENTE, 1960), necessitando de transformações que a tornem palatável (FERNÁNDEZ DÍEZ et al., 1985) e, por meio deste fruto da oliveira, obtêm-se diversos produtos, sendo os principais o azeite e as azeitonas de mesa.

Apesar de todas as cultivares de oliveira poderem ser utilizadas para a produção de azeitonas de mesa, algumas possuem propriedades mais adequadas, levando em consideração o tamanho do fruto, o seu sabor, forma, firmeza, relação polpa/caroço e facilidade de desprendimento da polpa do respectivo caroço (REJANO et al., 2010).

As azeitonas de mesa são atualmente o vegetal fermentado mais importante produzido nos países desenvolvidos, sendo muito apreciadas por ambas as suas características sensoriais e valor nutritivo, e sua utilização é extensa em todos os mercados do mundo (TOFALO et al., 2013).

O azeite de oliva também é apreciado por suas características organolépticas, bem como por sua alta estabilidade para cozinhar (CASAL et al., 2010; INGLESE et al, 2011.). Além disso, a demanda está aumentando devido à ampla e crescente evidência dos benefícios para a saúde humana do consumo de azeite de oliva resultante de seu alto teor de fenóis (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007), sendo uma fonte rica de antioxidantes naturais (CANTARELLI, 1961; MONTEDORO; CANTARELLI, 1969; PAPADOPOULOS; BOSKAU, 1991)

Estes efeitos benéficos do azeite de oliva podem ser devido aos seus componentes, tais como os compostos fenólicos, tocoferol, carotenoides, que demonstraram possuir propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (VISIOLI; GALLI, 1998; CICERALE et al., 2012).

Os cultivares comerciais Arberquina, Arbosana e Koroneiki têm sido testados com sucesso no Brasil para extração de azeite, e o cultivar Ascolana para a produção de azeitonas de mesa (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009).

Conforme Vieira Neto et al. (2008), a oliveira foi introduzida no Brasil no início do século XIX, nas regiões sul e sudeste. Hoje existem áreas com plantios comerciais nos estados do Rio Grande do Sul (Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Dom Pedrito, Encruzilhada do Sul, Rio Grande, Santana do Livramento e Vacaria), Minas Gerais (Maria da Fé) e em Santa Catarina (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009). Recentemente iniciou-se o cultivo de oliveiras nas áreas mais altas da Serra da Mantiqueira, o que tem aumentado o interesse dos produtores do Brasil (VIEIRA NETO et al., 2010).

Na América do Sul, a Argentina e o Chile são os principais produtores e exportadores de azeitona de mesa e azeite, respectivamente, com 100 mil e 10 mil hectares plantados (SILVA et al, 2012).

O Brasil é totalmente dependente da importação de azeitonas de mesa e azeites, com o seu consumo sendo suprido pela Comunidade Econômica Europeia, e pelos países Argentina, Chile e Peru (EMBRAPA, 2011).

De acordo com dados estatísticos recentes do Conselho Oleícola Internacional – COI (2013), o Brasil é um dos maiores mercados consumidores de produtos de oliveira (*Olea europae* L.). As importações brasileiras de azeite e bagaço de azeitona foram de 74.873,8 toneladas em 2012/13, sendo os países da União Europeia responsável por 88% desta tonelagem, onde Portugal lidera como maior fornecedor (57 %), seguido pela Espanha (25 %), Itália (6 %) e Grécia (1%). A porcentagem restante de 12 % das importações brasileiras foi fornecida pela Argentina (9 %), seguida do Chile (2 %) e diversos outros países (1 %).

Em relação ao mercado de azeitonas de mesa na temporada de 2012/13, o Brasil importou 109.051,1 toneladas. A repartição desta tonelagem em volume e país de origem revela que a Argentina é a principal fonte do Brasil, fornecendo 75 % de suas importações. Em seguida, vem a Espanha com uma quota de 13%, Peru com 11 % e Egito com 1 % (IOC, 2013).

Algumas justificativas para o consumo dos produtos de oliveira adquirir cada vez mais relevância no mercado brasileiro, além do mercado mundial são: o aumento do poder aquisitivo de algumas classes sociais, associado com produtos derivados de oliveira de preços mais acessíveis no mercado brasileiro e a divulgação dos benefícios do consumo do azeite de oliva para a saúde (BERTONCINI, 2012).

3.2 Método de propagação em oliveira

O processo de propagação vegetativa de plantas ocorre por meio da divisão e diferenciação de células, sem a participação de órgãos sexuais, sendo, portanto, designada como propagação assexuada (PIMENTEL, 2010). Consiste na multiplicação de indivíduos a partir de porções vegetativas das plantas em razão da capacidade de regeneração dos órgãos vegetativos (HARTMANN et al., 2002).

Existem vários métodos de propagação vegetativa de plantas, sendo que os principais métodos utilizados comercialmente são a estaquia, a micropopagação, a microestaquia, a miniestaquia e a enxertia (FERRARI; GROSSI; WENDLING, 2004).

A estaquia é o método de propagação mais utilizado na produção de mudas de oliveira (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009; NETO et al., 2010), sendo uma técnica que promove o enraizamento de partes da planta que podem ser ramos, raízes ou folhas retirados de uma planta original, constituindo-se a estaca, o material vegetal que irá gerar uma nova planta semelhante a àquela que lhe deu origem.

Até o final do século XX, o método de multiplicação da oliveira por estaquia utilizava estacas lenhosas de 50 a 60 cm de comprimento, enterradas diretamente na área do plantio. No entanto, esse método apresentou desvantagens, como a necessidade de grande quantidade de material vegetativo e maior tempo para a formação da muda, onerando o custo inicial da cultura. Posteriormente, passou-se a utilizar propágulos menores com 25 a 30 cm de comprimento, visando à melhoria na eficiência da estaquia e a redução do gasto com materiais vegetativos (CABALLERO; DEL RIO, 2006).

Atualmente, as oliveiras vêm sendo propagadas por meio de estacas semilenhosas com 12 cm de comprimento, dotadas de quatro folhas e enraizadas sob nebulização intermitente com mecanismos que permitem o aquecimento do substrato, instalados em casa de vegetação, possibilitando notáveis avanços no enraizamento das estacas de oliveira (CABALLERO; DELRIO, 2006; OLIVEIRA et al., 2012), ao empregar menor espaço, melhor qualidade e rapidez na obtenção das plantas em relação aos outros métodos, o que permite baixar os custos de produção (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009).

Esse sistema de enraizamento com estacas semilenhosas de oliveira realizado nos últimos 20 anos, na maior parte dos países oleícolas, resume-se em três fases: o enraizamento, durante o qual se tem a emissão de raízes adventícias na base das estacas; a aclimatação, onde se promove a funcionalidade do sistema radicular obtido, e, finalmente, a formação das mudas em viveiro (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009).

No entanto, mesmo com toda essa tecnologia, o percentual de enraizamento com estacas semilenhosas ainda é considerado baixo, a exemplo do trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2010b) que registraram apenas 12,7 % de enraizamento de estacas semilenhosas da oliveira ‘Arbequina’, tratando as estacas em solução de 3 g L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e utilizando como substrato a perlita (OLIVEIRA et al., 2012).

Os principais fatores envolvidos no enraizamento de estacas são o balanço hormonal; a constituição genética da planta matriz (potencial e variabilidade genética dentro da espécie); a maturação/juvenildade dos propágulos; a época do ano de coleta; fatores abióticos (temperatura, luz, umidade); o uso de reguladores de crescimento e a qualidade do substrato (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005; XAVIER et al., 2009).

Na estaquia, muitas vezes, a aplicação dos reguladores de crescimento é decisiva para a formação de raízes e tem por finalidade aumentar a porcentagem de estacas que formam raízes, acelerar sua iniciação, aumentar o número e a qualidade das raízes formadas e uniformizar o enraizamento (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

3.3 Fitohormônio

Fitohormônios ou hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas. São compostos orgânicos sintetizados no próprio vegetal, os quais, em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos do mesmo (CASTRO; VIEIRA, 2001).

O termo regulador de crescimento é normalmente empregado para compostos naturais (fitohormônio e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (hormônio sintético e regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta (CASTRO; SANTOS; STIPP, 2012).

Os fitohormônios vegetais podem ser classificados como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2004; KERBAUY, 2008). O grupo de reguladores de crescimento usado com maior frequência na indução de enraizamento é o das auxinas (HINOJOSA, 2000).

3.3.1 Auxina

As auxinas naturais são substâncias produzidas pelas plantas e destinam-se à regulação de processos fisiológicos, como o crescimento e a multiplicação celular,

influenciando fortemente a diferenciação e crescimento de órgãos novos, em particular, de raízes (HEEDE; LECOURT, 1989).

O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina natural mais conhecida (HARTMANN et al., 2002). Sua função está relacionada ao alongamento de células, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana; ao passo que é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As substâncias auxínicas formam-se naturalmente nas partes das plantas em crescimento ativo, tais como gomos e folhas jovens, sendo posteriormente transportadas, através do floema, para a base das estacas, onde se concentram e, deste modo, juntamente com outras substâncias nutritivas, estimulam a formação das raízes (HARTMANN et al., 2002; MONTEGUTI et al., 2008).

As auxinas que não existem na natureza denominam-se auxinas sintéticas e desempenham um papel semelhante às naturais. Como exemplos têm-se os ácidos indol-3-butírico (AIB), naftalenoacético (ANA), 2,4 - diclorofenoxiacético, naftoxiacético e tri-iodobenzóico (MEYER et al., 1983). As auxinas sintéticas são usadas como moléculas ativas em soluções comerciais para a horticultura como elas promovem a iniciação de raízes adventícias e a sincronização da floração e frutificação (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013).

Espécies vegetais cujas estacas não enraízam bem em condições naturais, quando tratadas com ácido indol-3-acético (AIA) ou seus análogos sintéticos emitem raízes com facilidade. Tratar as estacas com reguladores de crescimento, além de estimular a iniciação radicular, promove o aumento da porcentagem de estacas enraizadas, acelera o tempo de formação das raízes e, conseqüentemente, diminui a permanência das estacas no leito de enraizamento (BORTOLINI, 2006).

As auxinas AIA e o AIB, dentre as outras, são mais amplamente usadas para o enraizamento de estacas, por serem os compostos mais eficazes no estímulo da iniciação de raízes adventícias em estacas de muitas espécies (HARTMANN et al., 2002). Esses reguladores têm sido usados e pesquisados para várias espécies frutíferas e florestais (COSTA JUNIOR; SCARPARE FILHO; BASTOS, 2003; CARVALHO; CUNHA; RODRIGUES, 2005). Tais reguladores podem vir a ser tóxicos quando aplicados em altas concentrações (XAVIER; WENDLING; SILVA 2009; SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013), devido a estas propriedades, muitos compostos com atividade de auxina, têm sido desenvolvidos e utilizados como herbicidas (GROSSMANN, 2010).

Porém, de uso geral, a aplicação exógena de reguladores de crescimento sintético como o AIB, é uma das formas mais estudadas no favorecimento do balanço hormonal para o enraizamento, por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação por ação da luz, em comparação às demais auxinas sintéticas, podendo, em muitas espécies de difícil enraizamento, viabilizar a produção de mudas por meio da estaquia, elevando o teor de auxina no tecido (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

3.4 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

As rizobactérias são bactérias que habitam a rizosfera, com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo (GRAY; SMITH, 2005). A rizosfera, por sua vez, é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência direta do sistema radicular, sendo rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação e deposição. O crescimento e atividade de microrganismos são intensos na rizosfera, porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes podem ser utilizados como fonte de energia e carbono (DOBELLAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

A interação entre rizobactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (WHIPPS, 2001). Aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção do crescimento e, ou, proteção contra organismos patogênicos são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) ou bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (KLOEPPER et al., 1990).

Os primeiros estudos na década de 1950 começaram com o foco em bactérias fixadoras de nitrogênio. Desde então, um grande número de RPCP pertencentes a diferentes classes e gêneros de bactérias com características multifuncionais foram descritas (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008). As RCPC mais conhecidas incluem membros dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Arthrobacter* e *Rhizobium* (STURZ; NOWAK, 2000; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006; HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008).

As RPCP foram submetidas a inúmeras investigações envolvendo biotecnologia, aplicações na agricultura, horticultura, silvicultura e proteção ambiental (ZAHIR; ARSHAD; FRANKENBERGER et al., 2004). Dependendo do seu modo de ação, as RPCP podem ser classificadas como: biofertilizantes, correspondem à fixação biológica de nitrogênio e

utilização de formas insolúveis de fósforo, fitoestimuladoras, afetam o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios e biopesticidas, promovem o controle de agentes fitopatogênicos, principalmente pela produção de antibióticos e metabólitos antifúngicos, havendo certas rizobactérias com aplicações sobrepostas (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

O objetivo principal do desenvolvimento biotecnológico com base em RPCP tem sido desenvolver inoculantes do solo que podem contribuir com a agricultura sustentável, diminuindo assim a necessidade de uso de fertilizantes e pesticidas químicos (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009). As RPCP também têm sido usadas para remediar solos contaminados (ZHUANG et al., 2007) e em associação com espécies vegetais podem ajudar a promover a utilização mais eficiente das plantas nas práticas de fitorremediação (MA et al., 2011).

De acordo com a relação das RPCP com as plantas, elas podem ser simbióticas ou de vida livre (KHAN, 2005). Em geral elas também podem ser separadas em: rizobactérias extracelular (de vida livre), que vivem no solo próximo à raiz, no rizoplane, ou nos espaços intercelulares no córtex da raiz; e rizobactérias intracelulares (simbióticas), que vivem dentro das células das raízes, geralmente em estruturas especializadas, os nódulos (GRAY; SMITH, 2005).

O modo de ação das RPCP pode ser dividido em mecanismos que diretamente beneficiam o crescimento das plantas e mecanismos que indiretamente promovem o crescimento vegetal (AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, 2008). Os mecanismos diretos podem ser via produção ou alteração da concentração de fitohormônios, aumento do “status” nutricional da planta por meio da solubilização de fósforo e fixação biológica de nitrogênio (GLICK et al., 1999; ZAHIR; ARSHAD; FRANKENBERGER, 2004; SAHARAN; NEHRA, 2011). Enquanto que os mecanismos indiretos estão relacionados com o biocontrole de pragas e doenças, pela indução de resistência sistêmica aos patógenos de plantas, produção de antibióticos e captação de ferro através da produção de sideróforos que sequestram e disponibilizam os íons férricos para o vegetal (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; SAHARAN; NEHRA, 2011).

A produção de fitormônios por RPCP é considerada um dos mecanismos mais importantes pelos quais muitas rizobactérias promovem o crescimento de plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Estudos têm demonstrado que as RPCP podem estimular o crescimento de plantas através da capacidade de produzir hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocinas e etileno (DODD et al., 2010; CAMELO; VERA; BONILLA, 2011).

O ácido indol-3-acético (AIA) é o hormônio vegetal mais comum e melhor caracterizado. Estima-se que 80 % das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de sintetizar esta auxina natural (PATTEN; GLICK, 1996), a qual é responsável pela divisão, expansão e diferenciação das células e tecidos vegetais e estimula o alongamento das raízes (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

As rizobactérias podem sintetizar o AIA a partir de diversas vias metabólicas dependentes do aminoácido triptofano (trp), e também por vias independentes de triptofano (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). As vias biossintéticas de AIA dependentes do triptofano amplamente conhecidas e que ocorrem nas rizobactérias incluem: a via da indol-3-piruvato (IPyA), onde o triptofano é convertido a IPyA através de uma transaminação por uma trp aminotransferase ou de uma oxidação por uma L-aminoácido oxidase, e em seguida, o IPyA é descarboxilado através da indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) a indol-3-acetaldeído (IAAld), o qual é oxidado a AIA pela IAAld oxidase ou pela aldeído-desidrogenase. A via da indol-3-acetamida (IAM), consiste em duas etapas, sendo o triptofano metabolizado a IAM através de uma trp-monooxigenase, que posteriormente é convertida a AIA por uma IAM hidrolase (amidase). E a via da indol-3-acetonitrila (IAN) na qual algumas nitrilases catalisam a conversão de IAN a AIA (BACA; ELMERICH, 2007).

O AIA é produzido durante todos os estágios de crescimento da cultura bacteriana e bem depois da fase estacionária (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2009). Esta característica faz a rizobactéria especialmente qualificada para a promoção do crescimento de plantas, permanecendo o efeito do AIA durante semanas ou meses após a inoculação bacteriana na muda vegetal (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

A inoculação com RPCP produtoras de AIA tem sido usada para estimular a germinação de sementes, para acelerar o crescimento das raízes, modificar a arquitetura do sistema radicular, e para aumentar a biomassa de raízes (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

Entre as espécies de RPCP, as rizobactérias do gênero *Azospirillum* são as produtoras de AIA mais conhecidas e estudadas (DOBBELAERE et al., 1999). Podem ser isoladas a partir da superfície ou do interior das raízes de uma ampla variedade de espécies de plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, trigo e aveia (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004) e dicotiledôneas (MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984; VELÁZQUEZ; HERNÁNDEZ, 1999).

A espécie *Azospirillum brasilense* tem sido isolada de raízes e caules de arroz e plantas de cana-de-açúcar (LADHA; BARAQUIO; WATANABE, 1982; JAMES et al., 2000;

REIS et al., 2000), enquanto que a espécie *Azospirillum amazonense* tem sido isolada de cereais, gramíneas forrageiras e palmeiras no Brasil (MAGALHÃES, et al., 1983; MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984; BALDANI et al., 1997). Os primeiros relatórios com a *Azospirillum brasilense* mostraram que esta rizobactéria produziu menos de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em meio N-livre (NFb), e até 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em meio NH_4 suplementado com triptofano (TIEN; GASKINS; HUBELL, 1979), e isto ocorre porque a adição exógena deste aminoácido no meio de cultura pode aumentar a biossíntese de auxina pelas rizobactérias (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

Os efeitos da inoculação com rizobactérias do gênero *Azospirillum spp.* estão relacionados, principalmente, ao crescimento ou à morfologia das raízes, aumentando o número de raízes laterais e pêlos radiculares, levando a ampliação da superfície radicular, o que resulta em uma melhor absorção de nutrientes e de água, podendo ser o principal fator de aumento do crescimento vegetal (BOTTINI; CASSÁN; PICCOLI, 2004).

Dobbelaere et al. (2001) também avaliaram o efeito da inoculação do gênero *Azospirillum spp.* sobre o crescimento de algumas plantas agronomicamente importantes, e observaram um aumento significativo no peso seco de ambos os sistemas, radicular e aéreo, das plantas inoculadas com RPCP, resultando em um melhor desenvolvimento e floração.

Em alguns estudos, *Azospirillum* é utilizada como inoculante bacteriano, por si só ou em combinação com outros microrganismos, incluindo outra RPCP, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbios (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi isolada das raízes de cereais quando procuravam identificar novos isolados do gênero *Azospirillum spp.* (BALDANI et al., 1984). Podendo a rizobactéria *Herbaspirillum seropedicae*, por sua vez, ser isolada de muitas gramíneas, tais como milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1986), além de apresentar baixa sobrevivência em solo natural (BALDANI et al., 1996).

Um novo gênero de rizobactérias está sendo objeto de estudos, *Burkholderia*, que foi reclassificado a partir de linhagens antes incluídas no gênero *Pseudomonas* (YABBUCHI, KOSAKO et al., 1992). Diferentes espécies do gênero *Burkholderia* foram isoladas do interior das raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e arroz (BALDANI, 1996). Estudos posteriores estabeleceram que a grande maioria destes isolados fosse, na verdade, parte de uma nova espécie deste gênero, chamada *Burkholderia brasiliensis* (PERIN; SIMOES-ARAUJO; REIS, 2006), além de outras já descritas a partir de isolados presentes na rizosfera de café e milho, raízes e colmos de milho e cana-de-açúcar e rizosfera de cana-de-açúcar (REIS et al., 2004).

A inoculação de RPCP tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, e testada em alguns países, demonstrando bom potencial para o agronegócio (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004). Como por exemplo, em arroz (ACEBO et al., 2007), trigo (LEMOS et al., 2013), banana (WEBER et al., 2001), cana-de-açúcar (BENEDUZI et al., 2013), milho (HUNGRIA et al., 2010), entre outras culturas de importância econômica.

Segundo Hungria et al. (2010), no Brasil, considerando apenas a substituição parcial (50 %) do N-fertilizante, exigidos pelas culturas de milho e de trigo, pelas estirpes de *Azospirillum*, resultaria em uma economia estimada em 1,2 bilhões de dólares por ano em fertilizantes nitrogenados. E estes trabalhos têm-se desenvolvido de forma gradual e crescente, destinando o aumento do desempenho das culturas, e a diminuição do uso excessivo de fertilizantes minerais e produtos químicos, consequentemente reduzindo a contaminação ambiental (PARRA; CUEVAS, 2002).

Inoculantes comerciais contendo RPCP pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Bacillus* já foram lançados no mercado mundial para o uso da comunidade agrícola, com potencial fertilizante, controle de doenças vegetais e gerenciamento de pragas, tais como, Diegall, Galltrol-A, Zea-Nit, Azo-Green, Epic, Quantum 4000, Victus, Mycostop, entre outros (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Os efeitos proporcionados pela inoculação de RPCP sobre o enraizamento e crescimento de plantas, inclusive para a produção de mudas, também têm sido descritos em muitos estudos, tais como em eucalipto (MAFIA et al., 2007; MAFIA et al., 2009), kiwi (ERTUK et al., 2010), uva (SABIR, 2013), tomate (RIBAUDO et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2013), oliveira (MONTERO-CALASANZ et al., 2013), entre outros.

Dentre esses estudos, resultados indicaram que a inoculação de mudas de tomate com *Azospirillum brasilense* FT 326 promoveu o desenvolvimento das plantas, como revelado pelo aumento da parte aérea e biomassa radicular, altura da parte aérea, e da superfície total de raízes (RIBAUDO et al., 2006). Já as rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Comamonas*, entre as RPCP utilizadas no enraizamento de estacas de kiwi, obtiveram os maiores índices de enraizamento de estacas semilenhosas e lenhosas de kiwi, maximizando a produção de mudas clonais enraizadas em viveiro (ERTUK et al., 2010), enquanto que a inoculação isoladamente ou em combinação de rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* estimulou a formação de tecido caloso ao redor do ponto de enxerto de uva, e ajudou significativamente as plantas jovens a sobreviver (SABIR, 2013). Na indução do enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira, todos os tratamentos inoculados com as rizobactérias *Azospirillum*

brasiliense Cd, *Pantoea* sp. AG9, *Chryseobacterium* sp. AG13, *Chryseobacterium* sp. CT348 e *Pseudomonas* sp. CT364 apresentaram um enraizamento significativamente maior do que o observado no tratamento com a auxina sintética AIB, houve aumento no número de raízes adventícias e no comprimento médio total de raízes, sendo que apenas a estirpe *Pantoea* sp. AG9 produziu altas porcentagens de enraizamento independente do modo de inoculação, e em todas as cultivares testadas (MONTERO-CALASANZ et al., 2013). Os resultados obtidos por estes estudos sugerem a potencialidade das RPCP para substituir o uso de auxinas sintéticas na produção de material propagativo (ERTUK et al., 2010; SABIR, 2013).

No Brasil, ainda não existem restrições legais quanto à utilização do hormônio sintético, ácido indol-3-butírico (AIB), na agricultura orgânica e nem na convencional. Porém, todas as formulações sintéticas de reguladores de crescimento vegetal, como o AIB, não são autorizadas na indução de enraizamento da agricultura orgânica da Comunidade Europeia e dos Estados Unidos, de modo que, é necessário encontrar um sistema alternativo para melhorar a porcentagem de enraizamento natural das plantas (ERTURK et al., 2010; MONTERO-CALASANZ et al., 2013).

De acordo com o Regulamento nº 834/2007 e o Regulamento nº 889/2008 da Comunidade Europeia, o uso de produtos químicos sintéticos nos sistemas de agricultura orgânica é proibido. Na lista nacional do National Organic Program (NOP) dos Estados Unidos, também não existe atualmente qualquer substância permitida com capacidade de indução de raízes. Se o AIB é utilizado na produção de mudas, os produtores devem cultivar as plantas um ano sob condições orgânicas antes de a cultura poder ser certificada orgânica (TECHNICAL SERVICES BRANCH FOR THE USDA NATIONAL ORGANIC PROGRAM, 2011).

Além de hormônio sintético, o AIB é registrado como pesticida bioquímico pela *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos, sendo seu registro obrigatório neste órgão para poder usá-lo no cultivo de plantas, além de exigir que todos seus componentes sejam divulgados na demonstração da fórmula (TECHNICAL SERVICES BRANCH FOR THE USDA NATIONAL ORGANIC PROGRAM, 2011).

O papel dos mecanismos do hormônio sintético AIB no crescimento e desenvolvimento das plantas não está bem compreendido e ainda está em debate, assim como seus efeitos ambientais e na saúde não são suficientemente conhecidas (BEYOND PESTICIDES, 2013). Portanto, as aplicações ecológicas na agricultura ganharam maior relevância, em particular na horticultura e produção de viveiro, sendo que a utilização das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RCPC) pode ser uma potencial

ferramenta para a multiplicação de material vegetal em viveiro, substituindo o uso de auxinas sintéticas, resultando na obtenção de material propagativo orgânico (ERTURK et al., 2010; MONTERO-CALASANZ et al., 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição do protocolo experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação de polietileno, na unidade de produção de mudas de oliveira por estacas enraizadas, da Fazenda Experimental de Maria da Fé/MG, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (FEMF-EPAMIG), no período de abril a setembro de 2013.

As oliveiras utilizadas neste trabalho pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) situado na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Maria da Fé, Sul de Minas Gerais, a 22° 18' de latitude Sul e 45° 23' de longitude Oeste, altitude média de 1.276 metros e classificação climática de Köppen tipo Cwb, ou seja, clima temperado chuvoso (mesotérmico), também denominado subtropical de altitude e solo do tipo Latossolo Vermelho com textura média argilosa.

O experimento foi instalado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10x3, sendo 9 fontes produtoras de hormônio (4 isolados de bactérias + 4 estirpes-tipo + 1 hormônio sintético – AIB) e 1 testemunha (sem inoculação e sem AIB), 3 cultivares de oliveira, com 10 repetições, totalizando 300 unidades experimentais.

As três cultivares de oliveira, Grappolo 541, Arbequina e Maria da Fé, constituintes dos tratamentos, foram submetidas à inoculação com as estirpes-tipo, *Azospirillum brasilense* (BR 11001^l), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^l), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^l) e *Burkholderia brasiliensis* (BR 11340^l), e com os isolados bacterianos 32, 39, 42 e 48 (SILVA; MELLONI, 2011).

Tendo em vista que o ácido indolbutírico (AIB) é comumente empregado na FEMF como hormônio sintético para estimular e acelerar o enraizamento de estacas (OLIVEIRA et al., 2010a; OLIVEIRA et al., 2010b), este foi utilizado como uma forma de comparação ao tratamento de inoculação com os isolados selecionados e estirpes-tipo.

A testemunha, composta pelo meio de cultura Dygs sem inoculação de bactérias, foi utilizada para comparação do enraizamento de estacas de oliveira inoculadas com as rizobactérias e com aplicação do hormônio AIB.

Cada unidade experimental foi constituída por um copo plástico, com 8 cm de diâmetro por 10 cm de altura, e capacidade total de 300 mL, sendo preenchido com areia, e contendo cada um, duas estacas representantes de cada cultivar, resultando em 600 estacas de oliveira no total.

Os trezentos copos contendo as estacas inoculadas com os isolados, as estirpes-tipo e os tratamentos controle e com hormônio foram colocados no interior da casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente (automatizada por temporizador regulado para acionar às 6 h e desligar às 22 h, sendo as nebulizações acionadas a cada cinco minutos por um período de 10 segundos), em bancadas contendo areia com fundo aquecido servindo como suporte aos copos, sendo as estacas deixadas eretas.

As etapas do experimento que envolviam procedimentos em laboratório foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Itajubá-UNIFEI.

4.2 Seleção dos isolados de rizobactérias

Foram empregados quatro isolados de rizobactérias, representados pelos números 32, 39, 42 e 48, obtidos a partir de amostras de solo coletadas da Reserva Biológica Serra dos Toledos, localizada em Itajubá/MG.

Silva e Melloni (2011) avaliaram a densidade e diversidade fenotípica dos diversos grupos bacterianos provenientes das amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos, entre os quais os isolados de rizobactéria selecionados neste estudo são pertencentes.

Os isolados bacterianos 32, 39, 42 e 48 foram selecionados de acordo com a capacidade em produzir ácido indolacético (AIA), sendo estes os quais apresentaram as maiores concentrações de AIA, segundo trabalho preliminar realizado por Silva (2011).

As estirpes-tipo utilizadas para servirem como referenciais de parâmetro neste estudo foram *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t), provenientes da Embrapa-Seropédica, RJ.

4.3 Teste de viabilidade dos isolados em meios de cultura específicos

Os isolados que estavam devidamente numerados e armazenados em tubos eppendorf, em meio batata sólido (DOBEREINER et al., 1995), foram transferidos para miniplacas de Petri contendo meios de cultura específicos com consistência sólida, as quais foram incubadas em estufa a 28°C, durante dez dias.

Os meios usados foram os de origem de cada isolado, sendo NFb para *Azospirillum spp.* e JNFb para *Herbaspirillum spp.*, conforme descrito em Dobereiner et al., (1995), e o meio Fam para *Azospirillum amazonense*, descrito em Magalhães (1983).

As colônias isoladas nos meios sólidos foram transferidas novamente para os mesmos meios de cultura, porém com consistência semi-sólida, sendo este processo realizado em triplicata, e as culturas mantidas sob incubação por quinze dias a 28°C, conforme Melloni et al. (2004).

Os isolados foram considerados viáveis quando apresentaram crescimento bacteriano, devido à formação de fina película característica dessas bactérias próxima à superfície do meio, em toda a triplicata (Figura 1).



Figura 1 - Crescimento das colônias em meio de cultura semi-sólido: NFB, Fam e JNFb.

4.4 Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico dos isolados e estirpes-tipo

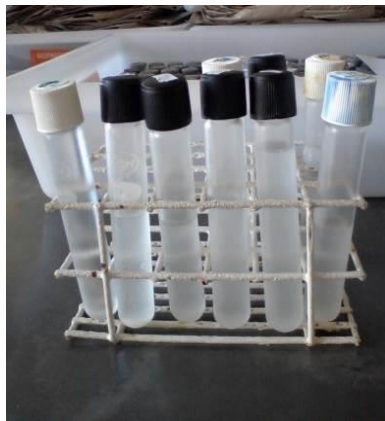
Inúmeras variações para o teste de Salkowski (MAYER, 1958) são comumente encontradas na literatura para a detecção de compostos indólicos produzidos por bactérias, entre eles, o AIA (KUSS et al., 2007; GALDIANO JÚNIOR, 2009).

Os isolados e as estirpes-tipo dos tubos eppendorf foram transferidos para erlenmeyers contendo meio líquido Dygs (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986) (Tabela 1), e submetidos à agitação em temperatura ambiente por três dias. Com uso do espectrofotômetro a 600 nm, foi determinada a densidade óptica (DO), em triplicata, da suspensão de cada isolado (por meio dos valores de absorbância), acrescentando-se solução salina 0,85 %, até se obter, após agitação do frasco, DO = 0,5 em 5 mL de suspensão (KUSS et al., 2007) (Figura 2). Para a realização da leitura utilizou-se solução salina como branco.

Tabela 1 – Composição do Meio de cultura Dygs

Ingredientes	Concentração
Glucose	2000 mg L ⁻¹
Peptona bacteriológica	1500 mg L ⁻¹
Ácido málico	2000 mg L ⁻¹
Extrato de levedura	2000 mg L ⁻¹
Ácido glutâmico	1500 mg L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	500 mg L ⁻¹
MgSO ₄ * 7H ₂ O	500 mg L ⁻¹
Ágar	15 g L ⁻¹

Faixa de pH entre 6 a 6,5



a



b

Figura 2 - Determinação da densidade óptica: suspensão bacteriana com solução salina em frasco (a) e leitura da absorbância para obtenção de DO = 0,5 (b).

Conforme metodologia de Kuss et al. (2007), alíquotas de 0,5 mL de solução de cada um dos isolados e estirpes, ajustadas para DO 0,5, foram colocadas para crescimento em meio líquido Dygs e agitadas por 72 horas a 30 °C (Figura 3).



a



b

Figura 3 - Crescimento com densidade óptica ajustada: retirando 0,5 mL de suspensão bacteriana e colocando em erlenmeyer contendo meio Dygs líquido (a), e agitação a 30°C (b).

Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante obtido, 3 mL foram vertidos em frascos, acrescentando-se 2 mL de reagente de Salkowski (2 mL de FeCl_3 0,5 mol L^{-1} + 98 ml de HClO_4 35%) (SARWAR; KREMER, 1995). Os frascos com o sobrenadante e o reagente de Salkowski foram armazenados em ambiente escuro por 30 minutos para desenvolvimento de cor, que se apresenta em tons de rosa avermelhado mais intenso, quando há mais quantidade de ácido indolacético. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm (SILVA, 2010) e para a realização da leitura foi utilizado como branco o meio líquido Dygs esterilizado, com adição do reagente de Salkowski, sem inoculação e água destilada. O meio de cultura Dygs utilizado para quantificação da produção de AIA não recebeu adição de triptofano, uma vez que este meio possui extrato de levedura o qual é uma fonte rica de aminoácidos, inclusive de triptofano (YAMADA et al., 2003). O processo de quantificação de ácido indolacético encontra-se representado na Figura 4.

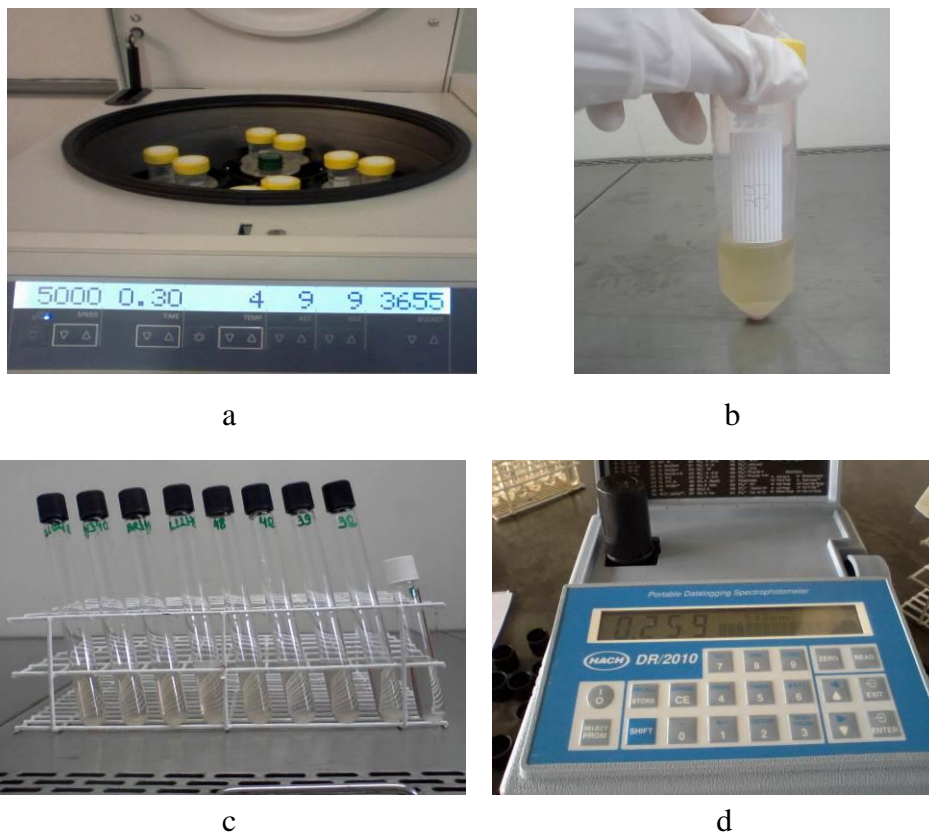


Figura 4 - Método colorimétrico: centrifugando os tubos contendo cada um 15 mL de suspensão bacteriana (a), retirando 3 mL do sobrenadante presente no tubo após a centrifugação (b), frascos contendo a adição de 3 ml do sobrenadante com 2 mL do reagente de Salkowski (c) e leitura da absorbância dos frascos com coloração em tons de róseo (d).

Assim como em Galdiano Júnior (2009), a concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio líquido Dygs esterilizado não inoculado; quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de uma solução 1 mg L^{-1} de ácido-3-indolacético comercial, e 2 mL do reagente de Salkowsky em cada frasco (Figura 5).

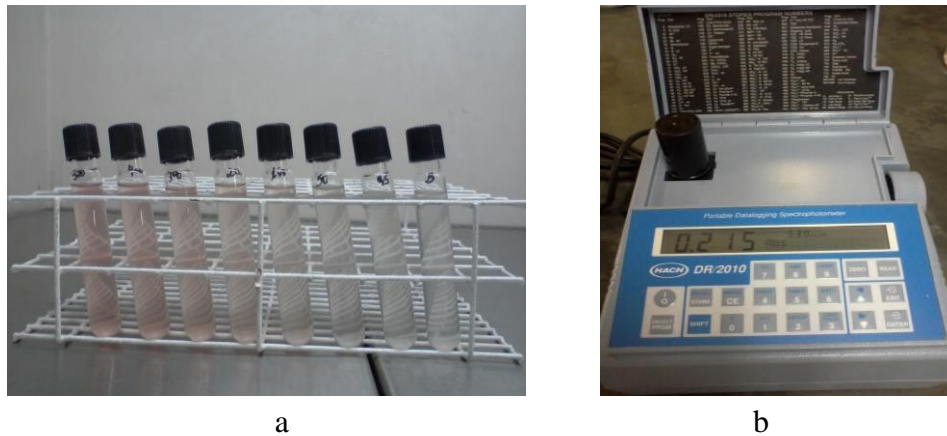


Figura 5 - Determinação da curva padrão de AIA: frascos contendo diferentes concentrações de AIA e apresentando coloração de acordo com a concentração de AIA colocada (a) e leitura da absorbância em espectrofotômetro (b).

A reta padrão para comparação da absorbância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelos isolados bacterianos e pelas estirpes-tipo constou de oito concentrações de AIA comercial (0, 0,5, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e gerou a equação $y = 0,0005x + 0,0041$, com $R^2 = 0,9926$ (Figura 6).

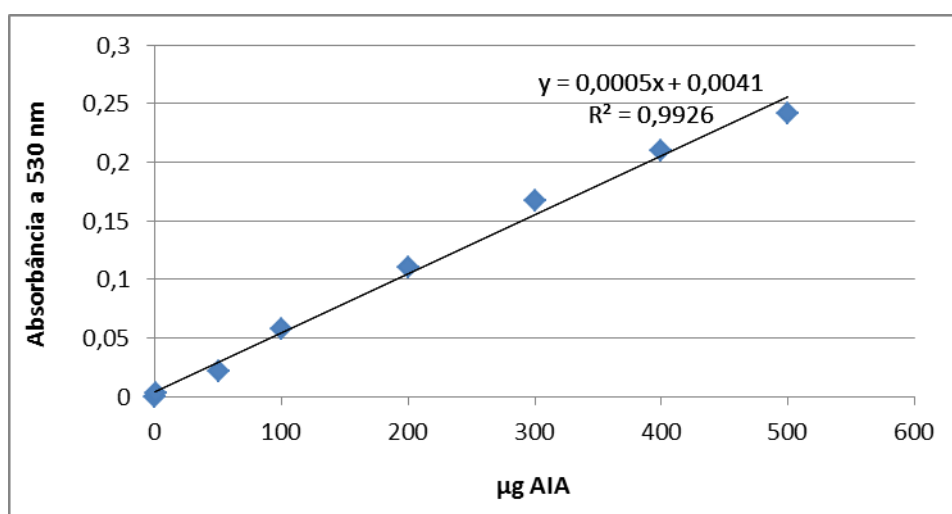


Figura 6 - Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial.

O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski permitiu identificar e quantificar os isolados capazes de produzir auxinas pela manifestação de cor em tons de róseo (Figura 7).

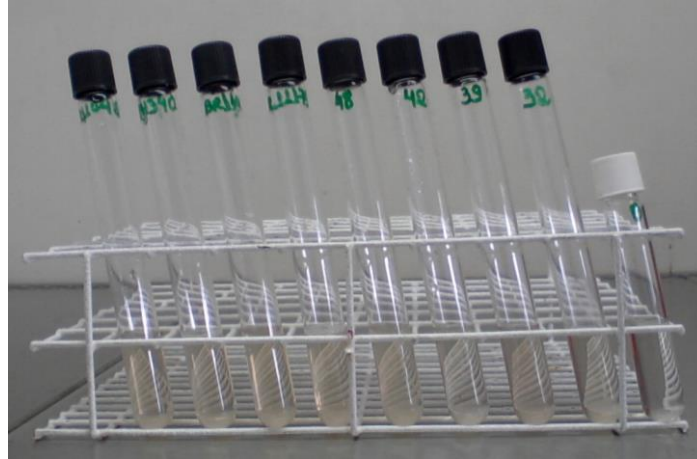


Figura 7 - Coloração de isolados e estirpes-tipo com produção de AIA.

4.5 Crescimento individual dos isolados e das estirpes-tipo

A técnica de crescimento bacteriano foi feita conforme Baldotto et al. (2010) com modificações. Isolados bacterianos selecionados e estirpes-tipo, armazenadas em tubos eppendorf, foram transferidas para erlenmeyers contendo meio líquido Dygs e submetidas à agitação a 28 °C por três dias, sendo este o tempo necessário para que atingissem a fase logarítmica (NÓBREGA et al., 2004). O processo de crescimento bacteriano dos isolados e estirpes-tipo é apresentado na Figura 8.

O crescimento individual obtido em meio líquido Dygs pelos isolados bacterianos e pelas estirpes-tipo na fase logarítmica constituíram os inóculos.

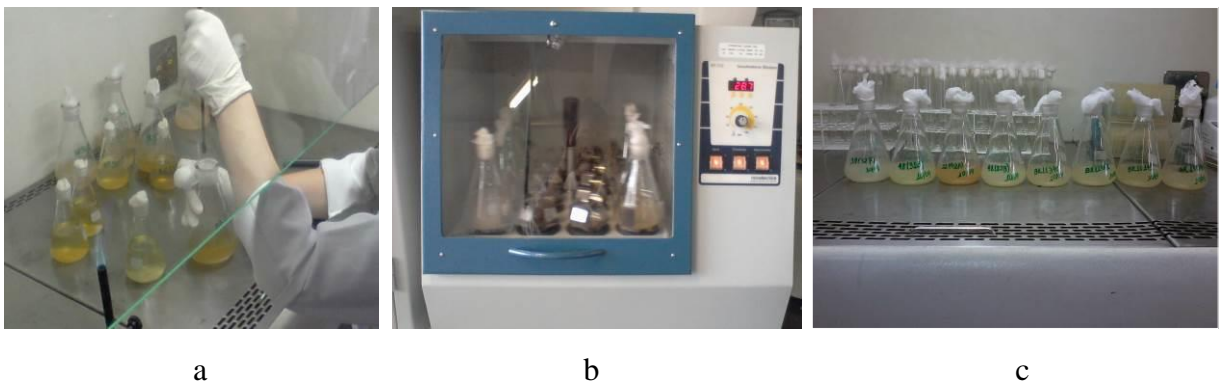


Figura 8 - Crescimento bacteriano: transferência de porção da colônia de cada isolado e estirpe-tipo para o meio líquido Dygs em erlenmeyer (a), agitação em temperatura ambiente (b), vista geral dos inóculos em erlenmeyers (c).

4.6 Avaliação da densidade bacteriana do inóculo

A partir de cada erlenmeyer contendo meio líquido Dygs, os isolados bacterianos e as estirpes-tipo, foram realizadas diluições sucessivas, onde se coletava 1 mL da diluição anterior e o colocava em 9 mL de solução salina (0,85 %), desde a diluição 10^{-1} até a diluição de 10^{-7} (Figura 9). Todos os tubos foram submetidos à agitação, proporcionando a diluição desejada.

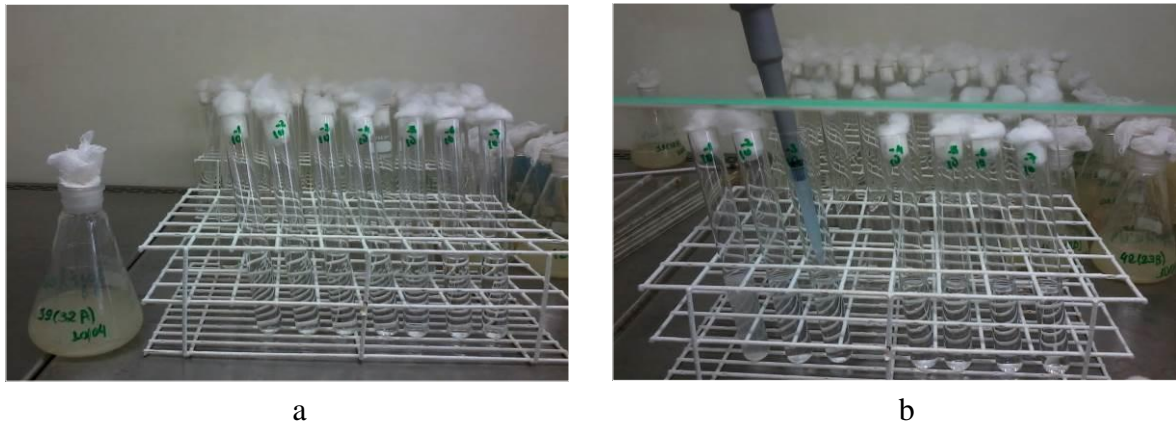


Figura 9 - Preparo das diluições do inóculo: vista geral do erlenmeyers contendo o inóculo e dos tubos com a solução salina (a), coletando-se 1 mL do tubo, e passando para a diluição seguinte (b).

Para a análise da densidade bacteriana, 0,1 mL das diluições 10^{-5} a 10^{-7} foram inoculadas em miniplacas de Petri contendo meio Dygs sólido e espalhadas com alça de Drigalsky. O processo foi feito em triplicata, e as placas foram incubadas a 28 °C por três dias (Figura 10).

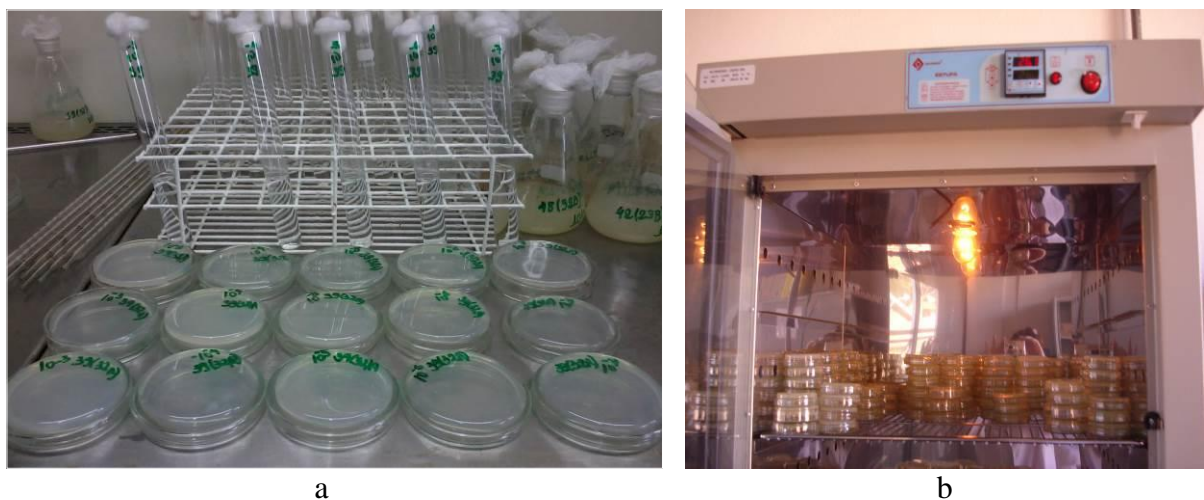


Figura 10 - Inoculação para avaliação da densidade do inóculo: vista geral dos tubos de ensaio com as diluições dos inóculos e passados à miniplaca de Petri (a), e incubação das placas (b).

Após o crescimento, foi selecionada a diluição com o crescimento mais indicado para a contagem (acima de 30 e abaixo de 300 colônias), realizando-se a contagem das colônias para cada triplicata, a fim de se ter uma média do número de colônias em cada inóculo (Figura 11).

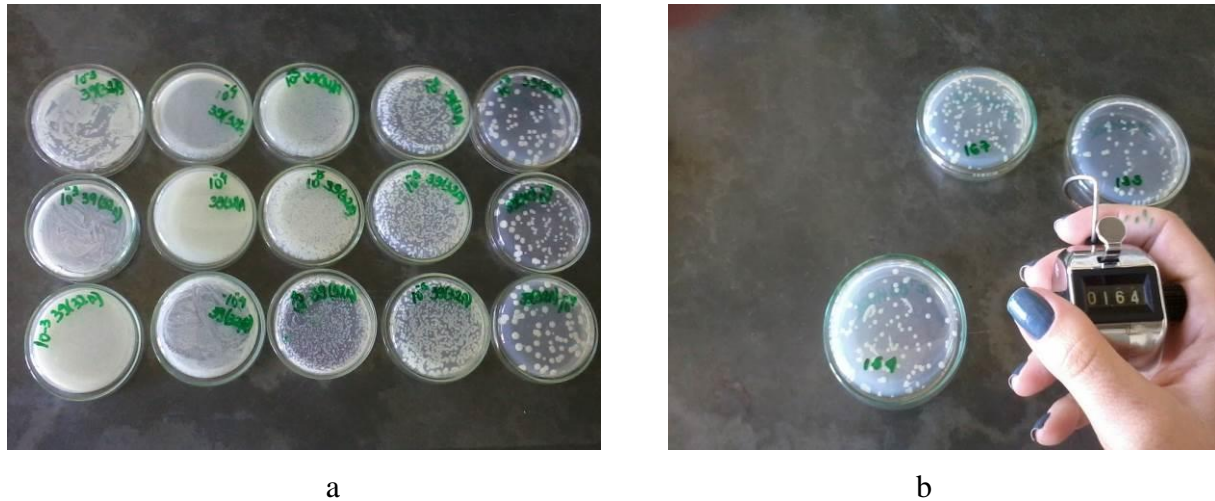


Figura 11 - Crescimento e contagem de colônias: crescimento no isolado 39 (a), e contagem de colônias na triplicata da diluição com crescimento adequado 9 (b).

O total de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada inóculo contendo os isolados de bactérias selecionados e as estirpes-tipo estudadas encontra-se na Tabela 2. Os isolados e as estirpes-tipo apresentaram valores de densidade bacteriana na ordem 10^7 a 10^9 . De acordo com Martínez-Viveros et al. (2010), em geral, as suspensões bacterianas de rizobactérias são preparadas a densidades de 10^8 - 10^9 UFC mL^{-1} para imersão de raiz e inoculação do solo.

Tabela 2 - Densidade bacteriana dos inóculos contendo isolados e estirpes-tipo

Número do isolado/estirpes-tipo	UFC (mL^{-1})
32	$1,25 \cdot 10^9$
39	$1,18 \cdot 10^9$
42	$1,07 \cdot 10^9$
48	$1,24 \cdot 10^9$
<i>Azospirillum brasilense</i> (BR 11001 [†])	$1,54 \cdot 10^9$
<i>Azospirillum amazonense</i> (BR 11040 [†])	$1,70 \cdot 10^7$
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (BR 11175 [†])	$1,50 \cdot 10^7$
<i>Burkholderia brasilensis</i> (BR 11340 [†])	$8,90 \cdot 10^7$

4.7 Preparo do substrato (areia)

A areia utilizada como substrato foi peneirada em malha de 2 mm, para retirar as impurezas finas, e colocada em balde com água corrente, sendo realizadas várias lavagens sucessivas para retirada da matéria orgânica. A areia lavada foi esterilizada em autoclave (Figura 12).



Figura 12 - Esterilização: transferindo a areia para autoclave (a), e esterilização em autoclave (b).

4.8 Fertilizante

O fertilizante Nippoterra empregado no experimento é o mesmo utilizado pela FEMF EPAMIG, e contém em sua composição 8 % de N, 6 % de P, 15 % de K, 0,2 % de Zn, 0,05 % de Cu, 0,2 % de Fe, 0,5 % de Mn, 0,4 % de B e 0,05 % de Mo. Esse fertilizante vem comprovando bons resultados no enraizamento e produção de mudas de oliveira, segundo Vieira Neto et al. (2010).

O cálculo da quantidade do fertilizante pelo volume de areia, diluído a 25 ml L^{-1} , foi feito conforme recomendações de Oliveira et al. (2010a), sendo adicionados, em cada copo, uma suspensão de 9,4 mL não esterilizada. O fertilizante foi colocado em dosagem única, em todos os copos dos tratamentos estudados, anteriormente ao estaqueamento (Figura 13).



Figura 13 - Fertilizante orgânico: vista geral do fertilizante diluído em água esterilizada (a), medindo o fertilizante diluído e colocando em cada copo contendo areia (b).

4.9 Obtenção das estacas

As cultivares de oliveira do banco de germoplasma da FEMF-EPAMIG utilizadas foram Grappolo 541, Arbequina e Maria da Fé, uma vez que estes cultivares são de interesse comercial e vêm sendo cultivados e estudados na Fazenda Experimental.

As estacas foram obtidas de ramos saudáveis e com folhas bem desenvolvidas, devidamente cortadas com aproximadamente 12 cm de comprimento, com quatro entrenós e quatro folhas inteiras na região apical, conforme Oliveira et al. (2010b).

Para o preparo das estacas foram realizados corte reto no ápice e outro em bisel na base da estaca, com a finalidade de aumentar a área de absorção, sendo que neste estudo, as estacas foram obtidas em 18 de abril de 2013 (Figura 14).



Figura 14 - Vista geral das estacas das cultivares Arbequina e Maria da Fé.

4.10 Desinfestação das estacas

O caule de todas as estacas foi desinfestado utilizando-se, primeiramente, álcool 70 %, ficando imersas as bases dos caules durante 10 segundos. Em seguida, as bases dos caules ficaram imersas em solução de hipoclorito de sódio 1 % por 3 minutos (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994), e depois foram realizadas cinco lavagens sucessivas de toda a estaca em água destilada e esterilizada (Figura 15).

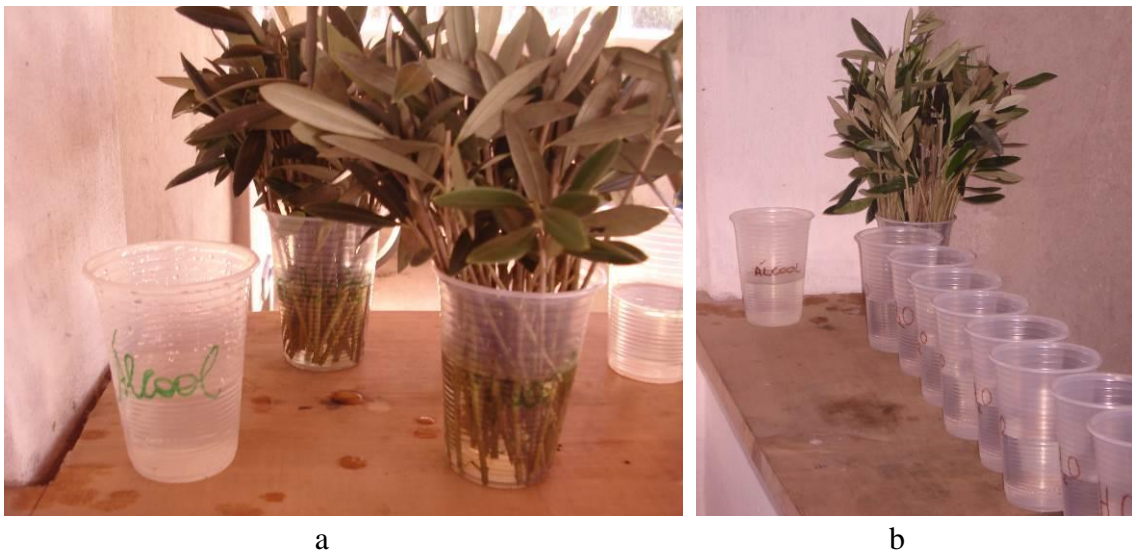


Figura 15 - Desinfestação das estacas: desinfestação das estacas com álcool e hipoclorito de sódio (a) e lavagens sucessivas com água destilada (b).

4.11 Inoculação das bactérias nas estacas, tratamento controle e tratamento hormônio

A técnica de inoculação e o tratamento controle foram feitos com base em Baldotto et al. (2010), com modificações.

As suspensões dos quatro isolados e das quatro estirpes-tipo, após agitação, foram colocadas em copos de plástico distintos. Os caules das estacas ficaram imersos em 125 mL de suspensões bacterianas durante 60 minutos, sendo este o dobro do tempo deixado em Baldotto et al. (2010), a fim de assegurar o maior tempo de contato da suspensão bacteriana com o caule da estaca, garantindo a infestação das estacas pelos inóculos bacterianos (Figura 16).



Figura 16 - Inoculação dos isolados bacterianos e das estirpes-tipo nas estacas: vista geral das estacas com caules imersos em suspensões bacterianas (a), caules das estacas da cultivar Grapollo imersas na estirpe-tipo *Azospirillum brasilense* (b).

No tratamento controle (Figura 17), as estacas de cada cultivar foram distribuídas entre os copos plásticos contendo meio líquido Dygs autoclavado sem inóculo bacteriano, ficando imersas durante 60 minutos. No tratamento hormônio não houve imersão das estacas em meio de cultura. Neste caso, as bases das estacas foram mergulhadas em ácido indolbutírico (AIB) (Figura 17), com concentração de 3 g L^{-1} , por cinco segundos, conforme as recomendações de Oliveira et al. (2010b).



Figura 17 - Imersão no tratamento controle e no hormônio AIB: base das estacas da cultivar Grapollo imersas no meio líquido Dygs autoclavado sem inóculo (a) e imersão da base das estacas da cultivar Grapollo em solução do hormônio AIB (b).

4.12 Plantio das estacas

Foram plantadas duas estacas por copo, contendo areia com fertilizante, a uma profundidade de 6 a 7 cm (Figura 18). Antes do plantio, em todos os copos foram feitos

quatro pequenos furos no fundo, a fim de evitar o encharcamento do material devido à nebulização na casa de vegetação da FEMF-EPAMIG.

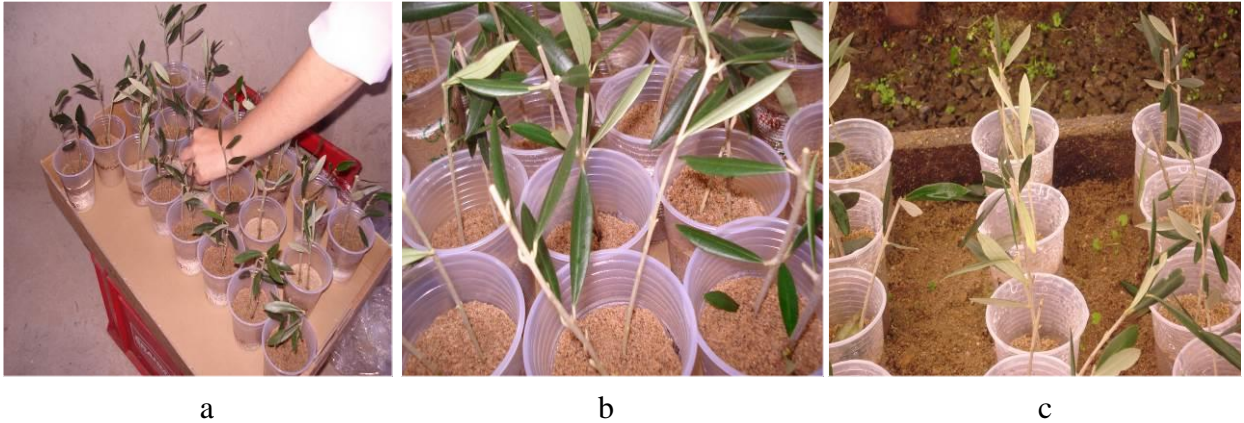


Figura 18 - Plantio das estacas: plantio de estacas da cultivar Grapollo que foram imersas em um determinado tratamento em estudo (a), vista geral de estacas plantadas (b), vista geral de estacas plantadas na bancada da casa de vegetação (c).

4.13 Condução do experimento

Ao longo de 150 dias em que as estacas ficaram na casa de vegetação, foram realizadas observações das condições do experimento, registrando-se queda de folhas, manutenção da umidade foliar, formação de calo, enraizamento, brotações, umidade do substrato e controle de doenças e pragas.

4.14 Variáveis analisadas

A coleta dos resultados foi realizada em dois períodos de tempo, com 120 dias e 150 dias após a instalação do experimento, ao contrário de Oliveira et al. (2012) e Silva et al. (2012), onde a mensuração das variáveis ocorreram aos 61 dias e 70 dias após o estaqueamento, respectivamente.

Decorridos 120 dias desde o estaqueamento, foi efetuada a primeira etapa da retirada de uma das estacas de cada copo, sendo avaliadas em todos os tratamentos as seguintes variáveis: porcentagem de estacas mortas (sem formação de calo e raízes), de estacas com calo e de estacas com calo enraizadas; número médio de raízes; comprimento médio de raízes conforme trabalhos de Pio et al. (2005), Oliveira et al. (2010a), Oliveira et al. (2010b), Vieira Neto et al. (2010) (Figura 19).

A segunda etapa da coleta de dados foi realizada depois de 150 dias da instalação do experimento, com um intervalo de 30 dias da primeira etapa, sendo verificadas em todos os tratamentos as mesmas variáveis. A avaliação do potencial de enraizamento foi feita visualmente e por meio de paquímetro analógico.

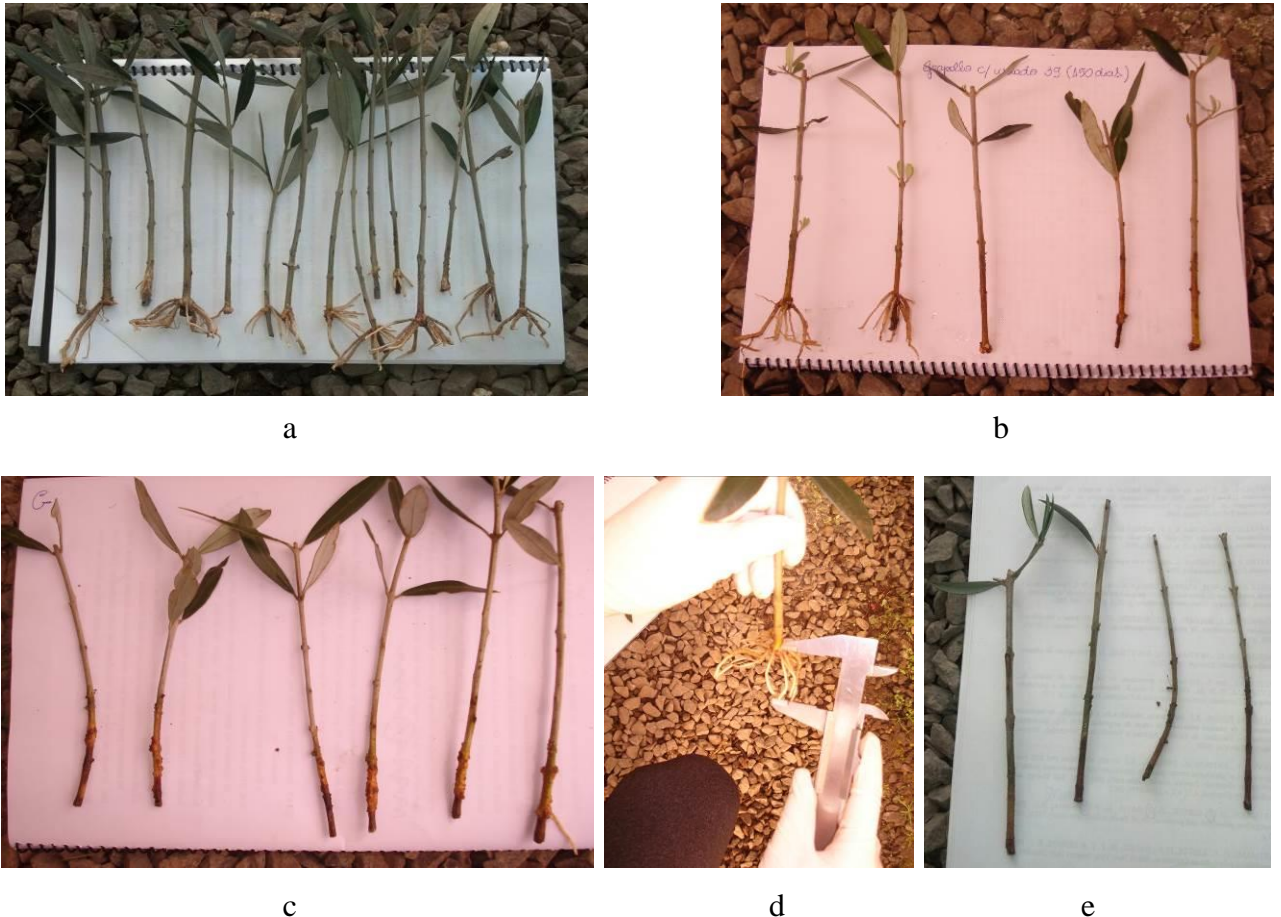


Figura 19 - Variáveis analisadas: estacas com raiz com 120 dias (a), estacas com calo da cultivar Grapollo com AIB aos 120 dias (b), estacas enraizadas e estacas calejadas com 150 dias da cultivar Grapollo inoculadas com o isolado 39 (c), medindo comprimento de raiz (d), e estacas mortas (e).

4.15 Análise estatística

As variáveis em estudo foram avaliadas separadamente por cultivar por meio da análise de variância (ANOVA) para o Modelo de Parcela-Subdividida. Quando a análise de variância mostrou efeito significativo, o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni foi aplicado com nível de significância a 5 % para comparação das médias.

Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS/PASWSTAT), versão 18.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação da produção de ácido indolacético pelos isolados e estirpes-tipo

Os resultados de produção de ácido indolacético (AIA) para os isolados e estirpes-tipo de rizobactérias encontram-se na Figura 20, os quais mostraram variação na produção entre as bactérias avaliadas.

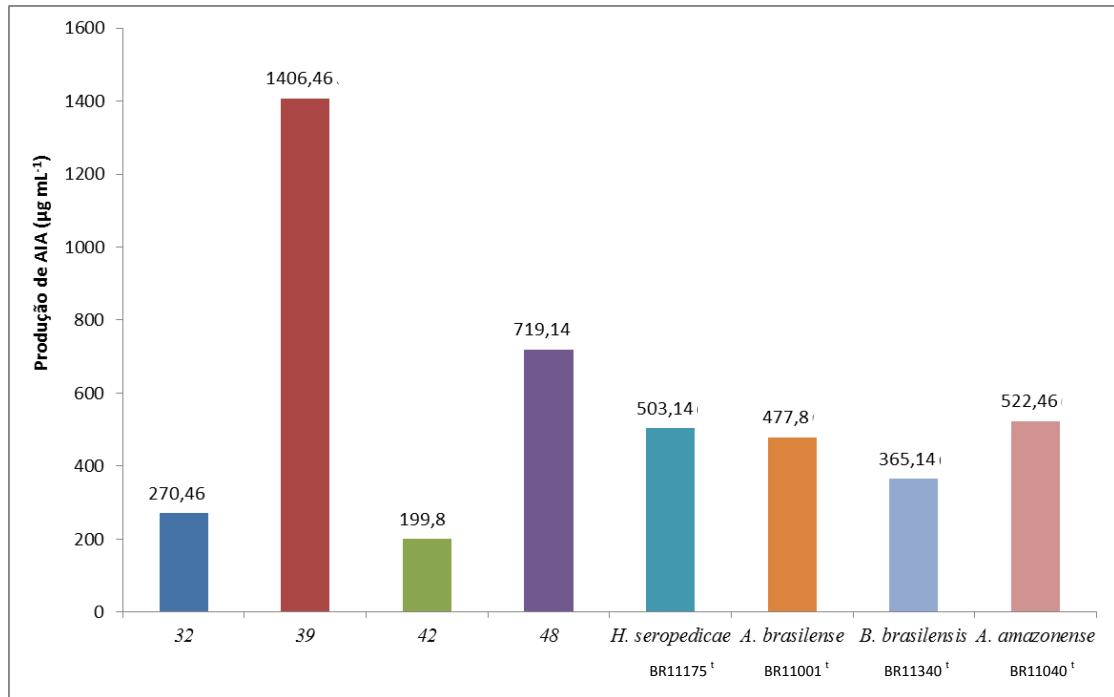


Figura 20 - Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados e estirpes-tipo.

Os isolados e estirpes-tipo apresentaram uma produção de AIA variando de 199,8 a 1.406,46 µg mL⁻¹, sendo a maioria dos valores relativamente maior à faixa encontrada em isolados obtidos de raízes de *Brachiaria brizantha* obtidos por Silva (2010), que foi de 0,39 a 195 µg mL⁻¹, e bem superiores aos isolados endofíticos obtidos de raízes de arroz de Kuss et al. (2007), onde variaram de 2,79 a 13,47 µg mL⁻¹, e dos isolados obtidos do solo, da rizosfera e endofíticos das orquídeas investigadas por Galdiano Júnior (2009), variando de 0,01 a 100,8 µg mL⁻¹.

Destaca-se que tanto as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR11001[†]) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175[†]) como a *Burkholderia brasilensis* (BR 11340[†]) e a *Azospirillum amazonense* (BR 11040[†]) apresentaram valores de produção de AIA relativamente maiores que os valores obtidos por estas mesmas estirpes-tipo no trabalho preliminar realizado com estacas de oliveira em Silva (2011).

Os valores de produção de AIA obtidos nas estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR11001^t) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t) foram superiores à mesma estirpe-tipo testada em Kuss et al. (2007) com produção de 5,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. brasilense* (BR11001^t), e às linhagens Abv5 e Br11.417, que pertencem as espécies *A. brasilense* e *H. seropedicae*, respectivamente, com produção de 42,5 e 105,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em Galdiano Júnior (2009).

Em relação à produção de AIA dos isolados apresentada neste estudo e os valores destes mesmos isolados em Silva (2011), observa-se que a produção de auxina do isolado bacteriano 32 diminuiu de 383,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 270,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o mesmo fato ocorreu no isolado 42, com o valor de produção obtido de 374,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ decaindo para 199,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes isolados apresentaram produção de AIA inferior ao averiguado anteriormente, e este fato pode ser explicado pelo período e condições de armazenamento, além das sucessivas repicagens realizadas em meio de cultura, na ausência de planta hospedeira ou rizosfera, cujas razões ainda não são esclarecidas (GYANESHWAR et al., 2001). Tsavkelova et al. (2007) mostraram que a produção bacteriana de AIA pode ser reduzida ou mesmo nula após a estocagem e conservação em óleo mineral durante seis meses. Os mesmos autores advertiram que a biosíntese bacteriana de AIA pode não se manter constante.

Porém os isolados 39 e 48 tiveram uma produção de AIA superior aos seus valores de produção obtidos em Silva (2011) com 1.406,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 719,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente contra 350,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 301,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em Montero-Calasanz et al. (2013), a rizobactéria *A. brasilense* Cd ATCC 29729 apresentou produção de AIA entre 7,6 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e as demais linhagens bacterianas também utilizadas para indução do enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira tiveram a produção de AIA variando entre 7 a 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, novamente abaixo dos valores obtidos no presente estudo. Esse resultado mostra que, mesmo sem a adição do triptofano, um dos precursores do AIA, e normalmente adicionado ao meio de cultura, os resultados apresentaram valores superiores aos de muitos estudos que adicionaram triptofano, sendo que, destes estudos comparados, o único sem adição foi o realizado por Kuss et al. (2007).

5.2 Avaliação do potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de RPCP

Procedeu-se à comparação das percentagens médias de estacas mortas, calejadas e enraizadas, número e comprimento médio de raízes entre os tratamentos contendo os inóculos bacterianos, o hormônio sintético AIB, e a testemunha/controle, por cultivares de oliveira, Arbequina, Grapollo 541 e Maria da Fé.

5.2.1 Cultivar Arbequina

Por meio da análise de variância, verificou-se que nenhum efeito foi significativo, tanto para o fator tratamento quanto para o fator tempo, em relação às variáveis em estudo da cultivar de oliveira Arbequina (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem da média de estacas mortas, com calo e enraizadas, número médio e comprimento médio de raízes por estacas de oliveira da cultivar ‘Arbequina’ coletadas com 120 e 150 dias.

Tratamentos	Estacas mortas (%)	Estacas com calo (%)	Estacas com raíz (%)	Número médio de raízes/estaca	Comprimento médio de raízes/estaca (cm)
AIB	90 ^{ns}	10 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Isolado 32	100 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Isolado 39	80 ^{ns}	20 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Isolado 42	100 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Isolado 48	95 ^{ns}	0 ^{ns}	5 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,02 ^{ns}
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (BR11175 ^t)	80 ^{ns}	15 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
<i>Azospirillum brasilense</i> (BR11001 ^t)	100 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
<i>Burkholderia brasilensis</i> (BR11340 ^t)	95 ^{ns}	5 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
<i>Azospirillum amazonense</i> (BR11040 ^t)	95 ^{ns}	5 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Controle	80 ^{ns}	15 ^{ns}	5 ^{ns}	0,7 ^{ns}	0,07 ^{ns}

ns – não significativo ($p > 0,05$).

5.2.2 Cultivar Grapollo 541

Na cultivar de oliveira Grapollo 541, o efeito do fator tratamento foi significativo em relação às variáveis da porcentagem média de estacas mortas, de estacas com calo e de estacas enraizadas (Tabela 4). Apenas as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t) diferiram estatisticamente do tratamento Controle em relação à porcentagem média de estacas mortas, apresentando um percentual elevado de 95 % e 90 % de estacas mortas respectivamente, contra 45 % de estacas mortas do tratamento Controle. Os valores médios percentuais de estacas mortas dos isolados bacterianos 32, 39, 42 e 48, do tratamento Controle e da estirpe-tipo *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t) não foram diferentes estatisticamente do menor percentual médio de estacas mortas, obtido pelo hormônio AIB, com 30 % de estacas mortas de oliveira. Entre os inóculos em estudo, o isolado 39 promoveu o menor percentual de estacas mortas, com 35 % de estacas mortas, e este valor diferiu estatisticamente das estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t). O percentual médio de 45 % de estacas mortas com o isolado bacteriano 42 também foi diferente estatisticamente das estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t).

Esse resultado indica que as estacas da cultivar Grapollo 541 inoculadas com os isolados bacterianos 39 e 42 apresentaram maior potencial de sobrevivência e desenvolvimento que as estacas inoculadas com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t). Esses inóculos em estudo apresentaram o mesmo efeito do hormônio AIB nesta cultivar, incrementando a taxa de sobrevivência das estacas, embora sem diferença estatística do tratamento Controle.

O tratamento com o hormônio sintético AIB proporcionou o maior percentual médio de estacas calejadas entre os tratamentos da cultivar Grapollo 541, com 55 % de estacas com calo. Esse valor difere estatisticamente da porcentagem média de estacas calejadas do tratamento Controle, que promoveu 15 % de estacas com calo, dos tratamentos com os isolados bacterianos 42 e 48, ambos com 20 % de estacas com calo, das estirpes-tipo *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t), com valores de 5 % e 10 % de estacas calejadas respectivamente, e das *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), as quais não obtiveram estacas com calo. Porém, a porcentagem média de estacas calejadas dos isolados 32 e 39 não foi estatisticamente diferente do tratamento com AIB, tendo o mesmo efeito desse na formação

de calo das estacas de oliveira Grapollo 541. O isolado 32 promoveu 30 % de estacas com calo, resultado estatisticamente diferente das estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), e o isolado 39 proporcionou 40 % de estacas com calo, a maior porcentagem média entre os isolados e as estirpes-tipo, diferindo estatisticamente das estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t).

Tabela 4 - Porcentagem da média de estacas mortas, com calo e enraizadas, número médio e comprimento médio de raízes por estacas de oliveira da cultivar ‘Grapollo 541’ coletadas com 120 e 150 dias.

Tratamentos	Estacas mortas (%)	Estacas com calo (%)	Estacas com raíz (%)	Número médio de raízes/estaca	Comprimento médio de raízes/estaca (cm)
AIB	30 d	55 a	15 abc	5,70 ^{ns}	0,20 ^{ns}
Isolado 32	65 bcd	30 abc	5 cd	1,00 ^{ns}	0,15 ^{ns}
Isolado 39	35 d	40 ab	25 abc	1,85 ^{ns}	0,36 ^{ns}
Isolado 42	45 cd	20 bcd	35 ab	1,55 ^{ns}	0,69 ^{ns}
Isolado 48	60 bcd	20 bcd	20 abc	0,70 ^{ns}	0,41 ^{ns}
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (BR11175 ^t)	60 bcd	10 cd	30 abc	1,15 ^{ns}	0,84 ^{ns}
<i>Azospirillum brasilense</i> (BR11001 ^t)	95 ab	0 d	5 cd	0,50 ^{ns}	0,16 ^{ns}
<i>Burkholderia brasilensis</i> (BR11340 ^t)	80 abc	5 cd	15 abc	1,10 ^{ns}	0,32 ^{ns}
<i>Azospirillum amazonense</i> (BR11040 ^t)	90 ab	0 d	10 bc	0,65 ^{ns}	0,22 ^{ns}
Controle	45 cd	15 bcd	40 a	2,05 ^{ns}	0,69 ^{ns}

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Bonferroni a 5% de significância. ns – não significativo ($p > 0,05$).

A formação de calo na base das estacas está intimamente relacionada com a formação de raízes, por isto, a presença de calos nas estacas indica diferenciações celulares

conhecidas como estruturas indicadoras da formação dos primórdios de raízes adventícias. Algumas cultivares de oliveira necessitam de um tempo maior para que ocorra esta diferenciação celular e suceda a formação de raízes adventícias após o processo de formação de calos (SILVA et al.,2012). Ambos os eventos ocorrem de maneira independente, porém necessitam das mesmas condições para sua ocorrência (HAN et al., 2009).

No caso da porcentagem média de estacas enraizadas na cultivar de oliveira Grapollo 541, notou-se que a não inoculação (Controle) obteve a maior porcentagem média de estacas com raiz entre todos os tratamentos, com o valor de 40 %, diferindo estatisticamente das estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^l) e *Azospirillum amazonense* (BR 11040^l), cujos valores de porcentagem média de enraizamento foram 5 % e 10 %, e do isolado bacteriano 32, com 5 % de estacas enraizadas. Entretanto, o isolado bacteriano 42 que promoveu o maior valor médio de estacas enraizadas entre os inóculos, com 35 % de enraizamento, obteve o mesmo efeito do tratamento Controle sob esta cultivar, e também do tratamento com hormônio AIB, o qual apresentou 15 % de estacas enraizadas, já que não houve diferenças estatísticas significativas entre estes tratamentos, sendo o resultado do isolado 42 estatisticamente diferente, apenas do isolado 32 e da estirpe-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^l).

O resultado da porcentagem média de enraizamento de estacas de oliveira obtido pelos tratamentos com AIB, estirpes-tipo e pelos isolados bacterianos na cultivar Grapollo 541 foram inferiores às porcentagens de enraizamento apresentadas pelos isolados bacterianos *Pantoea sp. AG9*, *Chryseobacterium sp. AG13*, *Chryseobacterium sp. CT348*, *Pseudomonas sp. CT364* e *Azospirillum brasilense Cd (ATCC 29729)* em trabalho de Montero-Calasanz et al. (2013), com estacas semilenhosas de oliveira das cultivares Arbequina, Picual e Hojiblanca, sob dois diferentes métodos de inoculação no ensaio de inverno. O isolado *Azospirillum brasilense Cd (ATCC 29729)* obteve a maior porcentagem de enraizamento, com 73 % de estacas enraizadas na cultivar Hojiblanca, aplicado como inoculante sólido, embora este método de inoculação tenha reduzido significativamente o enraizamento nas cultivares Arbequina e Picual. Na cultivar Arbequina, a maior porcentagem de enraizamento foi de 71 %, obtido pelo isolado *Chryseobacterium sp. CT348*, aplicado como inóculo em meio de cultura líquido como neste estudo, e a menor porcentagem de enraizamento foi de 6 %, na cultivar Picual, obtido pelo isolado *Chryseobacterium sp. AG13*, aplicado também como inóculo em meio de cultura líquido.

Em Montero-Calasanz et al. (2013), o isolado bacteriano *Pantoea sp. AG9* foi o único que sempre produziu altas porcentagens de enraizamento, independente do método de

inoculação e em todas as cultivares testadas, mesmo não sendo o melhor produtor de auxina, sendo a sua eficácia provavelmente explicada por outros mecanismos. Da mesma forma, nesse presente estudo com rizobactérias, observou-se que o isolado bacteriano 42 promoveu a maior porcentagem média de enraizamento na cultivar Grapollo 541, quando comparada aos demais isolados e estirpes-tipo (Tabela 4), embora não tenha sido o maior produtor de AIA (Figura 20).

Fatores internos e externos à planta matriz ou às estacas podem interferir no processo de enraizamento. São considerados fatores internos as condições fisiológicas da planta matriz, a idade da planta ou das estacas, o tipo de estaca (apical, mediana ou basal; herbácea, semilenhosa ou lenhosa), a época de coleta, o potencial genético de enraizamento, a sanidade da planta, o balanço hormonal e a possibilidade de oxidação de compostos fenólicos (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005). Como fatores externos citam-se a temperatura, a luz, a umidade, o substrato e os condicionamentos (lesão na base da estaca e a aplicação de reguladores de crescimento). A interação entre fatores permite melhor explicar as causas do enraizamento, ou seja, quanto mais difícil o enraizamento de uma espécie ou cultivar maior será a importância dos fatores que afetam (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005; OLIVEIRA et al., 2009), devendo, portanto, ser levados em consideração.

Considerando o fator interno, tempo de coleta, pode-se dizer que a obtenção e o plantio das estacas das cultivares de oliveira em estudo ocorreram em abril, período em que retomam seu crescimento e produção de assimilados, o que favorece o processo de enraizamento, pois as estacas possuem maior quantidade de substâncias de reserva, com o fim da fase produtiva das plantas de oliveira em meados de fevereiro e março. Além disto, em relação ao tipo de estaca, foram utilizadas estacas semilenhosas de oliveira e, segundo Hartmann et al. (2002), as estacas herbáceas e semilenhosas geralmente enraízam com maior facilidade e rapidez que as lenhosas, pois a menor lignificação dos tecidos facilita a passagem das raízes formadas no periciclo.

Porém, de acordo com Baldani e Baldani (2005), o efeito da inoculação na produtividade das plantas é dependente tanto do genótipo da planta quanto da estirpe da bactéria utilizada, bem como das condições ambientais (KHALID; ARSHAD; ZAHIR 2004). Assim, diferentes resultados na inoculação são esperados quando se trabalha com diferentes estirpes e diferentes genótipos.

E para manter as densidades celulares do inóculo bacteriano em condições comercialmente utilizadas, muitas vezes é necessário reinocular em intervalos durante o

período de produção (HAYAT et al., 2010; MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010). No entanto, esta última estratégia pode ser limitada pelo elevado custo de produção do inóculo e pela dificuldade em manter as células viáveis durante longos períodos de tempo de armazenagem (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010). Mas este fato pode ter sido um dos motivos pelo qual o isolado bacteriano 42 não tenha proporcionado enraizamento superior ao tratamento Controle na cultivar Grapollo 541, já que a inoculação de mudas no viveiro e antes do plantio pode aumentar a estabilização da comunidade de rizobactérias e sua persistência no campo. Esse fato pode explicar também o resultado superior do tratamento Controle no enraizamento em relação aos outros tratamentos com os isolados 32, 39, 48 e as estirpes-tipo, *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t), considerando o comprometimento da eficiência dos inóculos a partir da queda da densidade da população bacteriana ao longo do tempo.

Constatou-se que o fator tratamento não apresentou efeito significativo sob as variáveis, número e comprimento médio de raízes, e que também o fator tempo não apresentou efeito significativo em relação a nenhuma das variáveis em estudo da cultivar Grapollo 541.

5.2.3 Cultivar Maria da Fé

O efeito do fator tratamento sob a porcentagem média de estacas mortas e de estacas com calo foi significativo na cultivar de oliveira Maria da Fé (Tabela 5). A porcentagem média da mortandade de estacas foi alta em quase todos os tratamentos, sendo a menor porcentagem de estacas mortas de 55 % no tratamento sem inoculação (Controle), o qual foi diferente estatisticamente do tratamento com hormônio AIB, da estirpe-tipo *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t), ambos com a maior porcentagem de estacas mortas com 95 %, e do isolado bacteriano 48, com 90 % de estacas mortas. Todos os isolados bacterianos em estudo e todas as estirpes-tipo não diferiram estatisticamente do tratamento AIB, verificando-se o mesmo efeito de redução na taxa sobrevivência do tratamento com hormônio sintético sobre as estacas da cultivar Maria da Fé.

A alta taxa de estacas mortas dos tratamentos com os isolados 32, 39, 42 e 48 e com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t), *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t), pode ser em decorrência de uma queda da densidade da população bacteriana do inóculo ao longo do

tempo durante fase de produção de mudas em casa de vegetação, conforme já comentado anteriormente, comprometendo a eficiência dos inóculos na promoção da sobrevivência das estacas de oliveira Maria da Fé. Além disso, deve ser considerado tanto o genótipo da cultivar quanto da estirpe da bactéria utilizada, já que diferentes resultados do efeito da inoculação são esperados quando se avaliam diferentes estirpes e diferentes genótipos. No presente caso, no tratamento Controle (sem inoculação) obteve-se menor porcentagem de estacas mortas em relação aos tratamentos com inoculação em estudo.

Tabela 5 - Porcentagem da média de estacas mortas e com calo de estacas de oliveira da cultivar ‘Maria da Fé’ coletadas com 120 e 150 dias.

Tratamento	Estacas mortas (%)	Estacas com calo (%)
AIB	95 a	5 b
Isolado 32	80 ab	20 ab
Isolado 39	80 ab	20 ab
Isolado 42	75 ab	25 ab
Isolado 48	90 a	10 b
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (BR11175 ^t)	95 a	5 b
<i>Azospirillum brasilense</i> (BR11001 ^t)	75 ab	25 ab
<i>Burkholderia brasilensis</i> (BR11340 ^t)	75 ab	25 ab
<i>Azospirillum amazonense</i> (BR11040 ^t)	80 ab	20 ab
Controle	55 b	45 a

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Bonferroni a 5% de significância.

O tratamento com hormônio AIB, por sua vez, também promoveu elevada taxa de mortandade das estacas Maria da Fé. Apesar de a concentração utilizada ser comercialmente aceita e empregada, pode-se salientar que altas concentrações podem causar toxidez ao vegetal (TOFANELLI, 1999; WENDLING; XAVIER, 2005; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A maior porcentagem média de estacas calejadas na cultivar Maria da Fé, com 45 % de estacas com calo, foi obtida quando não houve inoculação (Controle), e esse resultado

diferiu estatisticamente do tratamento com AIB e da estirpe-tipo *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175^t), os quais apresentaram a menor porcentagem média de estacas calejadas, com apenas 5 %, e do isolado bacteriano 48 que obteve 10 % de estacas com calo. Em relação a essa variável, todos os isolados bacterianos em estudo e todas as estirpes-tipo não diferiram estatisticamente do tratamento AIB, verificando-se o mesmo efeito na formação de calo do tratamento com hormônio sintético.

O isolado bacteriano 42 e as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^t) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340^t) apresentaram a maior porcentagem de estacas calejadas, na cultivar Maria da Fé, entre todos os isolados e estirpes-tipo, ambos com 25 % de estacas com calo. Os resultados destas estirpes-tipo, incluindo da *Azospirillum amazonense* (BR 11040^t), e do isolado 42 foram maiores que aqueles obtidos por eles em relação a essa variável na cultivar Grapollo 541.

A formação de raízes adventícias em estacas pode ser direta e indiretamente controlada por genes, sendo a potencialidade de uma estaca em formar raízes variável com a espécie e cultivar (SILVA et al., 2012). Por isso, a cultivar Maria da Fé não apresentou estacas com raiz, e resultados favoráveis ao enraizamento como os obtidos pelos tratamentos da cultivar Grapollo 541, tratando-se de uma cultivar que possui maior dificuldade de enraizamento, de acordo com suas características genéticas. Portanto, pode-se atribuir a maior porcentagem média de estacas calejadas no tratamento Controle também às dificuldades intrínsecas da cultivar Maria da Fé em formar raízes, além da possibilidade da queda da eficiência dos inóculos ao longo do tempo. No entanto, o fator tempo não apresentou efeito significativo em relação a nenhuma das variáveis em estudo da cultivar Maria da Fé.

O isolado bacteriano 42, responsável pela maior porcentagem média de enraizamento na cultivar Grapollo 541, pertence ao grupo de bactérias que apresentaram potencial de utilização no enraizamento da cultivar Arbequina no trabalho preliminar feito por Silva (2011).

Em estudo de inoculação de RPCP em videira, Sabir et al. (2012) afirmaram que, além do sucesso na formação de calos, a taxa de sobrevivência em viveiro e crescimento inicial na vinha é essencial para uma utilização rentável na área agrícola, da mesma forma ocorrendo na produção de mudas de oliveira. Portanto, a fim garantir a viabilidade do uso comercial de inóculos bacterianos no cultivo de oliveira, deve ser levado em consideração o genótipo do vegetal e da linhagem bacteriana, veiculando as rizobactérias em um material que conserve as características dos isolados e mantenha a população bacteriana a níveis adequados ao longo do tempo.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados de rizobactérias pertencentes à Reserva Biológica Serra dos Toledos (Itajubá-MG), assim como as estirpes-tipo analisadas, apresentaram produção de AIA, sendo os valores da ordem de 199,8 a 1.406,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com destaque para o isolado bacteriano 39, com a maior produção.
- ✓ Na cultivar Grapollo 541, dentre os inóculos com rizobactérias, o isolado 39 proporcionou a maior porcentagem média de estacas calejadas, enquanto o isolado bacteriano 42, embora não tenha sido o maior produtor de AIA, apresentou a maior porcentagem média de enraizamento.
- ✓ A inoculação e o uso de AIB na cultivar Maria da Fé proporcionaram alta porcentagem média de estacas mortas, não sendo, portanto, recomendados para essa cultivar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar da continuidade de um trabalho realizado por Silva (2011), ainda inicial em relação à utilização de microrganismos do solo no enraizamento de oliveiras no Brasil, é possível que a metodologia de inoculação utilizada ainda não seja a mais eficiente e necessite de adaptações, a fim de incrementar as densidades celulares do inóculo bacteriano e mantê-las em condições de campo e ao longo do tempo.

Pode-se pensar na possibilidade de reinocular as bactérias em intervalos, durante o período de produção de mudas de oliveira, já que a inoculação de mudas no viveiro e antes do plantio pode aumentar a estabilização da comunidade de rizobactérias e sua persistência no campo.

Além de garantir a viabilidade do uso comercial de inóculos bacterianos no cultivo de oliveira, devem ser levadas em consideração as características genéticas do vegetal e da linhagem bacteriana, já que o efeito da inoculação é dependente de ambos, veiculando as rizobactérias em um material que conserve as características dos isolados e mantenha a população bacteriana a níveis adequados ao longo do tempo.

Nesse estudo, dentre as RPCP, os isolados bacterianos 39 e 42 apresentaram benefícios ao enraizamento da cultivar Grapollo 541, à medida que promoveram maior potencial de sobrevivência das estacas. O isolado 39 proporcionou maior porcentagem de estacas com calo, e o isolado 42 promoveu maior porcentagem de enraizamento, obtendo ambos o mesmo efeito do hormônio AIB.

O isolado bacteriano 42, responsável pela maior porcentagem de enraizamento na cultivar Grapollo 541, pertence ao grupo de bactérias que apresentaram potencial de utilização no enraizamento da cultivar Arbequina no trabalho feito por Silva (2011), confirmando seu potencial no enraizamento de estacas de oliveira.

De acordo com os resultados obtidos pelo tratamento AIB, esse hormônio não deve ser indicado para utilização na cultivar Maria da Fé, em virtude da taxa de mortalidade apresentada pelas estacas de oliveira.

Assim, os resultados obtidos por esse estudo sugerem a potencialidade das RPCP para substituir o uso de auxinas sintéticas na produção de material propagativo.

REFERÊNCIAS

- ACEBO, Y.; RIVES, N.; HEYDRICH, M.; HERNÁNDEZ, A. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum sp.* en el cultivo del arroz. **Cultivos Tropicales**, Cuba, v. 28, n. 3, p. 29-32, 2007.
- ADESEMOYE, A.O., KLOPPER, J.W. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1–12, 2009.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v.163, n.2, p.173-181, 2008.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 63-94.
- AYYADURAI N.; NAIK, P.R.; RAO, M.S.; KUMAR R.K.; SAMRAT, S.K.; MANOHAR, M.; SAKTHIVEL, N. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.100, n.4, p.926–937, 2006.
- BACA, B. E.; ELMERICH, C. Microbial production of plant hormones. In: Elmerich C, Newton WE, (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 113-143, 2007.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 365-371, 1984.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1996.
- BALDANI, J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L., GOI, S. R., DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. L. BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77 p. 549-579, 2005.
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.349-360, 2010.

BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. 5. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2004. 800 p.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 108, p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 521-577, 2004.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 28, n. 4 p.1327–1350, 2012.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 63, p. 94-104, 2013.

BERTONCINI, E. I. Cultivo de oliveiras no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 9, n. 2, 2012.

BORTOLINI, M. F. **Uso de ácido indol butírico na estaquia de *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.** 2006. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BOTTINI, R.; CASSÁN F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 497–503, 2004.

BOURQUELOT, E.; VINTILESCO, J C. R.. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique reuré de l'olivier (*Olea europea L.*). **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, Paris (France), v. 147, p. 533-535, 1908.

CABALLERO, J. M.; DEL RÍO, C. Propagação da Oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 33-38, 2006.

CAMELO, M.; VERA, S. P.; BONILLA, R. R. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, Colombia, v. 12, n. 2, p. 159-166, 2011.

CANTARELLI, C. The polyphenols of olives and olive oils. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 38, p. 69-72, 1961.

CAPPELLARO, T. H. **Produção de mudas de oliveira em sistemas de cultivo sem solo**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

CARVALHO, C. M.; CUNHA, R. J. P.; RODRIGUES, J. D. Enraizamento de estacas semilenhosas de lichieira utilizando ácido indol butírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 95-97, 2005.

CASAL, S.; MALHEIRO, R.; SENDAS, A.; OLIVEIRA, B. P. P.; PEREIRA, J. A. Olive oil stability under deep-frying conditions. **Food and Chemical Toxicology**, United Kingdom, v. 48, p. 2972–2979, 2010.

CASTRO, P. R. C.; SANTOS, V. M.; STIPP, S. R. Nutrição vegetal e biorregulação no desenvolvimento das plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 139, p. 9-15, 2012.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132p

CENTENO, A.; GÓMEZ-DEL-CAMPO, M. Effect of root-promoting products in the propagation of organic olive (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra) nursery plants. **HortScience**, Virginia, v. 43, n. 7, 2008.

CICERALE, S.; LUCAS, L. J.; KEAST, R. S. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. **Current Opinion in Biotechnology**, United Kingdom, v. 23, p. 129-135, 2012.

COSTA JUNIOR, W. H.; SCARPARE FILHO, J. A.; BASTOS, D. C. Estiolamento da planta matriz e uso de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de goiabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 301-304, 2003.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 125 p.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Washington, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155–164, 1999.

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

DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, United Kingdom, v. 157, p. 361-379, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)- Embrapa Clima Temperado Sistemas de Produção**, 2011. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/sistemas/sistemas-16/01_clima.htm Acesso em: 12 abr. 2012.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; HAZNEDAR, A.; CAKMAKCI, R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. **Biological Research**, Chile, v. 43, n. 1, p. 91-98, 2010.

EUROPEAN UNION. Council Regulation (EC) N° 834/2007, of 28 June 2007. On organic production and labelling of organic products and repealing. **Official Journal of the European Union**. Luxembourg, 28 June 2007, 23 p.

EUROPEAN UNION. Council Regulation (EC) N° 889/2008, of 5 September 2008. Laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. **Official Journal of the European Union**. Luxembourg, 5 Sept., 131 p.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. 1.ed., Brasília: Embrapa (Informação Tecnológica), 2005. 221p.

FERNÁNDEZ DÍEZ, M. J., CASTRO RAMOS, R., GARRIDO FERNÁNDEZ, A., GONZÁLEZ CANCHO, F., GONZÁLEZ PELLISSÓ, F., NOSTI VEGA, M., HEREDIA MORENO, A., MÍNGUEZ MOSQUERA, M. I., SÁNCHEZ ROLDÁN, F., AND CASTRO GÓMEZ-MILLÁN, A. **Biología de la aceituna de mesa**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de la Grasa, Madrid-Sevilla, 1985. 414 p.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Floresta, 2004. 22 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 94).

GALDIANO JÚNIOR, R.F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

GHANBARI, R.; ANWAR, F.; ALKHARFY, K. M.; GILANI, A. H.; SAARI, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v.13, p. 3291-3340, 2012.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. **Imperial College Press**, London, 1999.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDEL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.8, p.1968–1977, 2007.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p.395-412, 2005.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, United Kingdom, v. 66, p. 113–122, 2010.

- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P.M.; REINHOLDHUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of bacteriology**, Washington, v.183, n.8, p.2634-2645, 2001.
- HAMMAMI, S. B. M.; MANRIQUE, T.; RAPOPORT, H. F. Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 130, p. 445-451, 2011.
- HAN, H.; ZHANG, S.; SUN, X. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 3, p.348-353, 2009.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, United Kingdom, v.16, n. 10, p. 463–471, 2008.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS JR, F. T.; GENEVE. R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 2002. 880 p.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 60, p. 579–598, 2010.
- HEEDE, V.D., LECOURT, M. **El estaquillado. Guía práctica de multiplicación de las plantas**. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 1989.
- HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. PB. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, p. 15-54, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J; SOUZA, E. M; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, Netherlands, v. 331, p. 413-425, 2010.
- INGLESE, P.; FAMIANI, F.; GALVANO, F.; SERVILI, M.; ESPOSTI, S.; URBANI, S. Factors affecting extra-virgin olive oil composition. **Horticultural Reviews**, New Jersey, v. 38, p. 83–147, 2011.
- INTERNACIONAL OLIVE COUNCIL (IOC). **Spotlight on brazilian imports: olive oil and table olives**. Market Newsletter, n. 77, 2013. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org>>. Acesso em: 08 maio, 2014.
- JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W. L.; MATHAN, N.; LADHA, J. K. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: Ladha JK, Reddy PM (eds) **The quest for nitrogen fixation in rice**. International Rice Research Institute, Los Banõs, p. 119–140, 2000.
- KADOURI, D., SARIG, S. AND OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 871–879, 2001.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 473–480, 2004.

KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Amsterdam, v. 18, p. 355–364, 2005.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229–1244, 2004.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 452p.

KLOPPER, J. W.; ZABLOTOWICZ, R. M.; TIPPING, E. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth-promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. **In The Rhizosphere and Plant Growth**. Eds. D L Keister and P B Cregan. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 315–326, 1990.

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

LADHA, J. K.; BARAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p.478–485, 1982.

LEMONS, J. M.; GUIMARÃES, V. F.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; SANTOS, M. F.; OFFEMANN, L. C. Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 189–198, 2013.

LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, United States, v. 63, p. 541–556, 2009.

MA, Y.; PRASAD, M.N.V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, United States, v. 29, p. 248-258, 2011.

MAFIA, R.G; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E. M.; SIQUEIRA, L. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.5, p.813-821, 2007.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, G. M.V.; MOUNTEER, A. H. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.1-9, 2009.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 15, p. 246-252, 1984.

MAGALHÃES, F. M. M.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGALHÃES, F. M. M. **Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio**. 1983. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 1983.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, Italy, v. 45, p. 45, 73–80, 2009.

MARTÍNEZ, L. L.; PENICHE, R. A. M.; ITURRIAGA, M. H.; MEDRANO, S. M. A.; AGUILAR, J. R. P. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto em el crecimiento de tomate y pimiento. **Revista Fitotecnia Mexicana**, México, v. 36, n. 1, p. 63 - 69, 2013.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of Soil Science Plant Nutrition**, Chile, v. 10, n. 3, p. 293-319, 2010.

MAYER, A. M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v. 162, p.1670-1671, 1958.

MAYER, N. A. **Propagação assexuada do porta enxerto umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estacas herbáceas**. 2001. 109 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

MELGAR, J. C.; MOHAMED, Y.; NAVARRO, C.; PARRA, M. A.; BENLLOCH, M.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Long-term growth and yield responses of olive trees to different irrigation regimes. **Agricultural Water Management**. v. 95, p. 968 – 972, 2008.

MELLO, M.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopatologica**. Jaguariúna, v.38, n.3, p.50-60, 2002.

MELO, I. S. **Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas**. Jaguariúna, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br>>. Acesso em: 04 maio 2014.

MEYER, B., ANDERSON, D., BHING, R., FRATIANE, D. **Introdução à fisiologia vegetal**. 2.^a ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.

MONTEDORO, G. F.; CANTARELLI, C. Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio di oliva. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 46, p. 115–124, 1969.

MONTEGUTI, D.; BIASI, L. A.; PERESUTI, R. A.; SACHI, A. T.; OLIVEIRA, O. R.; SKALITZ, R. Enraizamento de estacas lenhosas de porta-enxertos de videira com uso de fertilizante orgânico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 99-103, 2008.

MONTERO-CALASANZ, M. C.; SANTAMARÍA, C.; ALBAREDA, M.; DAZA, A.; DUAN, J.; GLICK, B. R.; CAMACHO, M. Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 11, n. 1, p. 146-154, 2013.

MUSUMECI, G.; TROVATO, F. M.; IMBESI, R.; CASTROGIOVANNI, P. Effects of dietary extra-virgin olive oil on oxidative stress resulting from exhaustive exercise in rat skeletal muscle: A morphological study. **Acta Histochemica**, Germany, v. 116, p. 61–69, 2014.

NATIONAL ORGANIC STANDARDS BOARD (NOSB). **Results from the Spring 2013 meeting of the National Organic Standards Board**. Beyond Pesticides. Disponível em: <<http://www.beyondpesticides.org>>. Acesso em: 07 maio 2013.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.269-279, 2004.

NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; BENSALIM, S.; RICHARDS, J.; STEWART, A.; SMITH, C.; STEVENS, D. STURZ, A.V. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.52, p.97–103, 1998.

OLIVEIRA, M. C.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; SANTOS, V. A.; SILVA, F. O. R. Enraizamento de estacas em cultivares de oliveiras promissoras para a Serra da Mantiqueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 147-150, 2012.

OLIVEIRA, M. C.; NETO, J. V.; PIO, R.; OLIVEIRA, A. F.; RAMOS J. D. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas a aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 337-344, 2010a.

OLIVEIRA, M. C.; VIEIRA NETO, J.; OLIVEIRA, R. S.; PIO, R.; OLIVEIRA, N. C.; RAMOS, J. D. Enraizamento de estacas de duas cultivares de oliveira submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, p. 99-103, 2010b.

OLIVEIRA, A. F.; CHALFUN, N. N. J.; ALVARENGA, A. A.; VIEIRA NETO, J.; PIO, R.; OLIVEIRA, D. L. de Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluído em NaOH e álcool. **Ciência e Agrotecologia**, Lavras, v.33, n.1, p.79-85, 2009.

OLIVEIRA, A. F.; VIEIRA NETO, J.; ALVARENGA, A.A.; MESQUITA, A.D.; GONCALVES, E.D. **Propagação da oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas**. Belo Horizonte: EPAMIG, v.1, 2008, 48p. (EPAMIG, Boletim Técnico, 90).

- OLIVEIRA, A.F. **Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões in vitro de oliveira (*Olea europaea L.*)**. 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- PANIZZI, L., SCARPATI, M. L., & ORIENTE, G. Costituzione dell'oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo. Nota II. **Gazzetta dei Chimici Italiani**, Firenze, v. 90, p.1449–1485, 1960.
- PARRA, Y.; CUEVAS, F. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. **Cultivos Tropicales**, La Habana (Cuba), v. 23, n. 3, p. 31-41, 2002.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.
- PAPADOPOULOS, G.; BOSKAU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 669–671, 1991.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, Vancouver, v. 42, p. 207–220, 1996.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; RUANO, J.; PEREZ-MARTINEZ, P.; LOPEZ-SEGURA, F.; LOPEZ-MIRANDA, J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim (Germany), v. 51, p. 1199–1208, 2007.
- PERIN, L.; SIMOES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V.M. **O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 32 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 219).
- PIMENTEL, A. S. A. **Capacidade de enraizamento de estacas semi-lenhosas de oliveira das variedades Cobrançosa, Verdeal, Negrinha e Santulhana**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em em Gestão de Recursos Florestais). Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico, Portugal, 2010.
- RAPOPORT, H. F. Botánica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Ed.). **El cultivo del olivo** 2. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1998. p. 35-60.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D; DÖBERENER, J. Biological dinitrogen fixation in the gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton (USA), v. 19, p. 227–247, 2000.
- REIS, V.M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica sp. nov.*, a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading (United Kingdom), v.54, p. 2155-2162, 2004.

REJANO, L.; MONTAÑO, A; CASADO, F. J.; SÁNCHEZ, A. H.; CASTRO, A. Table Olives: Varieties and Variations. **Food Biotechnology Department**, Instituto de la Grasa CSIC, Seville (Spain), v. 1, p. 5-15, 2010.

RIBAUDO, C.M.; KRUMPHOLZ, E. M.; CASSÁN, F. D.; BOTTINI, R.; CANTORE, M. L.; CURÁ, J. A. *Azospirillum sp.* promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, United States, v. 24, p. 175–185, 2006.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS-GONZALÉS, B.; POZO-CLEMENTE, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rhizobacteria. In: I. Ahmad, J. Pichtel, J., S. Hayat (eds). **Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany), p. 55–80, 2008.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopatológica**, São Paulo, v12, p.16, 1986.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, United States, v.19, p.827-837, 2006.

RUIZ-DOMÍNGUEZ, M. L.; RAIGÓN, M. D.; PROHENS, J. Diversity for olive oil composition in a collection of varieties from the region of Valencia (Spain). **Food Research International**, United Kingdom, v. 54, p. 1941–1949, 2013.

SABIR, A. Improvement of grafting efficiency in hard grafting grape *Berlandieri* hybrid rootstocks by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 164, p. 24–29, 2013.

SABIR, A., YAZICI, M.A., KARA, Z., SAHIN, F. Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (*Vitis spp.*) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal of the Science Food and Agriculture**, United Kingdom, v. 92, p. 2148–2153, 2012.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, Beaverton (USA), v. 21, p. 1–30, 2011.

SARAMAGO, I. S. L. **Olival em modo de produção biológico**. 2009. 225 f. Dissertação (Mestrado em Produção Integrada) – Instituto Politécnico de Beja-Escola Superior Agrária, Portugal, 2009.

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

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Netherlands, v.172, p.261-269, 1995.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ZAMBON, C. R.; OLIVEIRA, D. L. Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p.488-492, 2012

SILVA, M. C. P. **Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha***. 2010. 79p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA, T. F. de. **Diversidade e potencial de utilização de bactérias diazotróficas não simbióticas no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Meio ambiente e Recursos hídricos) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2011.

SILVA, T.F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá/MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, n.2, p.359-371, 2011.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo-PR, n. 46, p. 21-30, 2003.

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

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2004. p.454-460.

TECHNICAL SERVICES BRANCH FOR THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE NATIONAL ORGANIC PROGRAM. **Indole-3-Butyric Acid (IBA)**. Technical Evaluation Report. USA, 2011. 17 p.

THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.114–123, 2004.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G.; CORSETTI, A. Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 161, p. 203–208, 2013.

TOFANELLI, M. B. D. **Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de pessegueiro em diferentes concentrações de ácido indolbutírico**. 1999. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1016–1024, 1979.
- TSAVKELOVA, E. A., CHERDYNSTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Jena (Germany), v. 162, n.1, p. 69-76, 2007.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal (Princípios e Técnicas)**. Viçosa, MG. Ed. UFV, 2009. 272 p.
- VELÁZQUEZ, M.; HERNÁNDEZ, A. N. Genética y regulación del metabolismo nitrogenado em *Azospirillum*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 41, p. 309-314, 1999.
- VIEIRA NETO, J.; CANCADO, G.M.A.; OLIVEIRA, A.F.; MESQUITA, H.A.; LUCIO, A.D.; SILVA, L.F.O. Fertilizantes na produção de mudas de oliveira Arbequina. **Scientia Agraria**, Curitiba-PR, v.11, n.1, p.49-55, 2010.
- VIEIRA NETO, J.; OLIVEIRA, A.F.; OLIVEIRA, N.C.; DUARTE, H.S.S.; GONCALVES, E.D. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. 1. ed. Belo Horizonte: EPAMIG, v.1. p.10-14, 2008.
- VISIOLI, F.; GALLI, C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 4292–4296, 1998.
- WEBER, O.B.; CORREIA, D.; ROCHA, M.W.; ALVEZ, G.C.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.1419-1426, 2003.
- WEBER, O. B; CRUZ, L. M; BALDANI, J. I; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 201-205, 2001.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487–511, 2001.
- WIESMAN, Z. **Desert olive oil cultivation : Advanced Biotechnologies**. New York: Elsevier Inc., 2009. 398 p.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Japan, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

ZAHIR, A. A., ARSHAD, M., FRANKENBERGER, W.T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, Newark (USA), v. 81, p. 97-168, 2004.

ZHUANG, X. L.; CHEN, J.; SHIM, H.; BAI, Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environmental International**, New York, v. 33, p. 406-413, 2007.