

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS NO ENRAIZAMENTO DE
ESTACAS SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

Talita Filomena Silva

Itajubá, Maio de 2011

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

Talita Filomena Silva

**DIVERSIDADE E POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS NO ENRAIZAMENTO DE
ESTACAS SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

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

Área de Concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Guimarães Pereira Melloni

Maio de 2011
Itajubá - MG

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Cristiane Neli C. Carpinteiro- CRB_6/1702

S586d

Silva, Talita Filomena

Diversidade e potencial de utilização de bactérias diazotróficas não simbióticas no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) / por Talita Filomena Silva. -- Itajubá (MG) : [s.n.], 2011. 77 p. : il.

Orientador: Prof^o. Dr. Rogério Melloni

Coorientadora : Prof^a. Dra. Eliane Guimarães Pereira Melloni

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá

1. Inóculo. 2. Fixação biológica de nitrogênio . 3. Bactérias promotoras de crescimento. 4. Diversidade fisiológica. 5. Olivicultura. I. Melloni, Rogério, orient. II. Melloni, Eliane Guimarães Pereira, coorient. III. Universidade Federal de Itajubá . IV. Título.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Criada pela Lei nº 10.435, de 24 de abril de 2002

ANEXO II

FOLHA DE JULGAMENTO DA BANCA EXAMINADORA

Título da Dissertação: **“Diversidade e Potencial de Utilização de Bactérias
Diazotróficas não Simbióticas no Enraizamento de Estacas
Semilenhosas de Oliveira (*Olea europaea* L.)”**

Autor: **Talita Filomena Silva**

JULGAMENTO

Examinadores	Conceito		Rubrica
	A = Aprovado	R = Reprovado	
1º	A		
2º	A		
3º	A		
4º	A		

Observações:

- 1) O Trabalho será considerado Aprovado se todos os Examinadores atribuírem conceito A.
- 2) O Trabalho será considerado Reprovado se forem atribuídos pelos menos 2 conceitos R.
- 3) O Trabalho será considerado Insuficiente (I) se for atribuído pelo menos um conceito R. Neste caso o candidato deverá apresentar novo trabalho. A banca deve definir como avaliar a nova versão da Dissertação.
- 4) Esse documento terá validade de **60 dias a contar da data de defesa.**

Resultado Final: A ou seja, APROVADO

Observações: _____

Itajubá, 27 de Maio de 2011.

Profª. Drª. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
1º Examinador – ESALQ/USP

Profª. Drª. Ana Lúcia Fonseca
2º Examinador - UNIFEI

Profª Drª Eliane Guimarães P. Melloni
3º Examinador - UNIFEI

Prof. Dr. Rogério Melloni
4º Examinador - UNIFEI

Àqueles que me apóiam sempre e que tenho grande afeto, Jáder e Judith, meus pais, e Alencar e Jéssica, meus irmãos.

À minha querida e eterna avó Maria de Lourdes (*In memoriam*).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professores Dr. Rogério Melloni e Dr^a. Eliane Guimarães Pereira Melloni, pelo apoio, amizade e por acreditarem no meu trabalho.

À FAPEMIG pelo apoio.

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

À FEMF-EPAMIG por mostrar interesse no trabalho e disponibilizar material e local para o experimento. Aos funcionários José, Celina e Silvana, pela ajuda na produção das estacas e Emerson Dias Gonçalves por todo apoio e incentivo.

Ao Laboratório de Informações Hídricas pelo fornecimento de veículo para o transporte do material até a cidade de Maria da Fé, e ao Laboratório de Química por conceder material, ambos da UNIFEI.

À professora Dr^a. Ana Lúcia Fonseca pelo auxílio nos materiais necessários, pelos comentários na qualificação e por fazer parte da minha banca de defesa.

À professora Dr^a. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso por aceitar o convite de participar da banca de defesa.

Ao técnico do laboratório Paulo Sérgio Marques pela companhia e ajuda no laboratório e no transporte à Maria da Fé.

A minha irmã Jéssica Maria Silva por auxiliar na retirada de material em Maria da Fé.

A minha família por todo apoio e incentivo, sem vocês nada disso seria possível.

E a todos que de certa forma me ajudaram ou fizeram parte desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) atuam no desenvolvimento das plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio e também através da produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Esse trabalho objetivou avaliar a diversidade fisiológica de isolados e estirpes-tipos de BDNS e a utilização destes no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira na FEMF-EPAMIG. Os isolados foram distribuídos em 5 grupos (G1 a G5) e as estirpes-tipo usadas foram *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*. A diversidade fisiológica foi feita através de experimentos de solubilização de fosfato, tolerância a diferentes condições de pH e temperatura, resistência a antibióticos e produção de ácido indolacético (AIA). Para avaliação do potencial de enraizamento nas estacas semilenhosas de oliveira foram utilizadas os cultivares Ascolano 315, Arbequina e Grappolo 541. Realizaram-se 33 tratamentos onde as estacas foram inoculadas com os grupos bacterianos, com as estirpes-tipo, sem inoculação (controle) e apenas com hormônio ácido indolbutírico (AIB). Apenas dois isolados mostraram capacidade de solubilização de fosfato. Os grupos de isolados e das estirpes-tipo apresentaram exigências ambientais muito similares com amplas faixas de condições ótimas de pH (5-9) e temperatura (15-35°C) para máximo crescimento. Os grupos de isolados e estirpes-tipo apresentaram maior sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol, estreptomicina e kanamicina. Já os antibióticos azitromicina e gentamicina foram os mais indicados para diversidade fisiológica. Os isolados e estirpes-tipo apresentaram uma produção de AIA variando de 110,53 a 383,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que os grupos dos isolados em geral não diferiram significativamente dos valores obtidos pelas estirpes-tipo. A inoculação de estirpes-tipo e dos grupos G1 e G4 em estacas do cultivar Arbequina possibilitou enraizamento semelhante àquele promovido com hormônio, e apresenta potencial de utilização no processo de produção de mudas de oliveira.

Palavras-chave: inóculo, fixação biológica de nitrogênio, bactérias promotoras de crescimento, diversidade fisiológica, olivicultura, produção de mudas.

ABSTRACT

Non-symbiotic diazotrophic bacteria (NSDB) influence plant growth through biological nitrogen fixation and also production and release of plant growth-regulating substances. This study aimed to evaluate the physiological diversity of isolates and reference strains of NSDB and the use of semi-hardwood cuttings in the rooting of the olive in FEMF EPAMIG. The isolates were divided into five groups (G1 to G5) and reference strains were used Azospirillum brasilense, A. amazonense, Herbaspirillum seropedicae and Burkholderia brasilensis. The diversity of physiological experiments was performed using phosphate solubilization, tolerance to different conditions of pH and temperature, antibiotic resistance and production of indole acetic acid (IAA). To evaluate the potential of semi-hardwood cuttings rooting in olive cultivars were used Ascolano 315, Arbequina and Grappolo 541. There were 33 treatments where the stakes were inoculated with the bacterial groups, with reference strains, without inoculation (control) and only hormone indole butyric acid (IBA). Only two isolates showed ability to solubilize phosphate. Groups of isolates and reference strains showed very similar environmental requirements with wide ranges of optimum conditions of pH (5-9) and temperature (15-35°C) for maximum growth. Groups of isolates and reference strains showed greater sensitivity to the antibiotics chloramphenicol, streptomycin and kanamycin. Since the antibiotics azithromycin and gentamicin were the most suitable for physiological diversity. The isolates and reference strains showed a production IAA ranging from 110.53 to 383.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the groups of isolates generally did not differ significantly from the values obtained by reference strains. The inoculation reference strains and G1 and G4 on stakes of Arbequina cultivar allowed similar to that promoted rooting hormone, and has potential for use in the production process of olive seedlings.

Keywords: *inoculum, biological nitrogen fixation, growth-promoting bacteria, physiological diversity, olive, production of seedlings.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1. Vista das áreas estudadas em Silva e Melloni (2011).....	28
Figura 4.2. Riscagem em meio de cultura sólido	29
Figura 4.3. Repicagem em meio de cultura semi-sólido	29
Figura 4.4. Crescimento das colônias em meio de cultura semi-sólido	30
Figura 4.5. Crescimento bacteriano	32
Figura 4.6. Preparo dos inóculos dos grupos de bactérias.....	32
Figura 4.7. Retirada de suspensão de cada meio líquido.....	33
Figura 4.8. Preparo das diluições com suspensão de bactéria.....	33
Figura 4.9. Inoculação para avaliação da densidade bacteriana	34
Figura 4.10. Densidade bacteriana em placas de Petri de diferentes tamanhos	34
Figura 4.11. Crescimento e contagem de colônias	35
Figura 4.12. Solubilização de fosfato	35
Figura 4.13. Tolerância a diferentes pH's	37
Figura 4.14. Tolerância a diferentes temperaturas	38
Figura 4.15. Resistência a antibióticos	39
Figura 4.16. Discos de antibióticos analisados e halos formados	39
Figura 4.17. Determinação da densidade óptica.....	40
Figura 4.18. Crescimento com densidade óptica ajustada.....	41
Figura 4.19. Método colorimétrico.....	41
Figura 4.20. Coloração de isolados com e sem produção de AIA.....	42
Figura 4.21. Determinação da curva padrão de AIA.....	42
Figura 4.22. Lavagem da perlita.....	44
Figura 4.23. Esterilização e disposição da perlita	44
Figura 4.24. Distribuição da perlita nos copos	44
Figura 4.25. Fertilizante orgânico	45
Figura 4.26. Cultivares de oliveira estudados.....	46
Figura 4.27. Obtenção e armazenamento das estacas de oliveira.....	47
Figura 4.28. Desinfestação das estacas.....	47
Figura 4.29. Inoculação dos grupos de bactérias nas estacas	48
Figura 4.30. Inoculação das estirpes-tipo nas estacas	48

Figura 4.31. Imersão nos tratamentos controle e hormônio	49
Figura 4.32. Plantio das estacas.....	50
Figura 4.33. Armazenamento das estacas plantadas.....	50
Figura 4.34. Casa de vegetação	51
Figura 4.35. Estacas nos copos no interior da casa de vegetação.....	51
Figura 4.36. Distribuição dos tratamentos ao longo da bancada.....	52
Figura 4.37. Queda de folhas.....	53
Figura 4.38. Avaliação do potencial de enraizamento.....	54
Figura 5.1. Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados e estirpes-tipo de BDNS	62
Figura 5.2. Resultado da análise de componentes principais para as médias dos atributos relacionados à sobrevivência e desenvolvimento das estacas diante dos diferentes tratamentos	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Distribuição dos isolados selecionados em grupos.....	31
Tabela 4.2. Densidade bacteriana nos isolados, estirpes-tipo e grupos formados.....	36
Tabela 4.3. Características dos cultivares de oliveira estudados.....	46
Tabela 5.1. Valores de crescimento dos isolados dentro dos grupos e estirpes-tipo de BDNS em diferentes condições de pH	57
Tabela 5.2. Valores de crescimento dos isolados dentro dos grupos e estirpes-tipo de BDNS em diferentes condições de temperatura	58
Tabela 5.3. Faixa de crescimento ideal de pH e temperatura dos agrupamentos analisados de BDNS.....	58
Tabela 5.4. Diâmetro médio dos halos de inibição formados nos discos dos antibióticos testados em cada isolado bacteriano e estirpe-tipo	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Caracterização de bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS).....	14
<i>Gênero Azospirillum</i>	15
<i>Gênero Herbaspirillum</i>	17
<i>Gênero Burkholderia</i>	17
3.2. Produção de substâncias reguladoras de crescimento por BDNS.....	19
3.3. Inoculação de BDNS para o crescimento vegetal.....	20
3.4. Aspectos gerais sobre oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).....	22
3.5. Propagação de oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Origem dos isolados de BDNS.....	27
4.2. Teste de viabilidade dos isolados em meios de cultura específicos.....	28
4.3. Seleção dos isolados a serem estudados.....	30
4.4. Distribuição dos grupos de BDNS e estirpes-tipo estudadas.....	30
4.5. Crescimento individual dos isolados e das estirpes-tipo.....	31
4.6. Preparo dos inóculos dos grupos de bactérias.....	32
4.7. Avaliação da densidade bacteriana.....	33
4.8. Testes de diversidade fisiológica dos isolados e estirpes-tipo de BDNS.....	35
<i>a. Solubilização de fosfato</i>	35
<i>b. Crescimento em diferentes condições de pH</i>	36
<i>c. Crescimento em diferentes condições de temperatura</i>	37
<i>d. Resistência a antibióticos</i>	38
<i>e. Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico</i>	40
4.9. Experimento de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de BDNS.....	43
<i>a. Preparo do substrato (perlita)</i>	43

<i>b. Fertilizante</i>	45
<i>c. Obtenção das estacas</i>	45
<i>d. Desinfestação das estacas</i>	47
<i>e. Inoculação das bactérias nas estacas, tratamento controle e tratamento hormônio</i>	47
<i>f. Plantio das estacas</i>	49
<i>g. Casa de vegetação</i>	50
<i>h. Condução do experimento</i>	53
<i>i. Avaliação do potencial de enraizamento</i>	53
<i>j. Análise estatística</i>	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Testes de diversidade fisiológica dos isolados e estirpes-tipo de BDNS	56
<i>a. Solubilização de fosfato</i>	56
<i>b. Crescimento em diferentes condições de pH e temperatura</i>	56
<i>c. Resistência a antibióticos</i>	59
<i>d. Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico</i>	61
5.2. Avaliação do potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de BDNS	63
6. CONCLUSÕES	65
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. ANEXO	77
ANEXO 1. Médias dos atributos relacionados à avaliação do potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira pela inoculação de BDNS	77

1. INTRODUÇÃO

Bactérias diazotróficas são aquelas que fixam N_2 atmosférico e ainda podem colonizar o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças às plantas (DÖBEREINER, 1992a). As associações entre diazotróficos e não-leguminosas são denominadas comumente de fixação de N_2 associativa (BALDANI et al., 1997a). Essas bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS), assim chamadas por Kennedy et al. (2004), apesar de serem aeróbias, apenas conseguem fixar o N_2 quando o mesmo se encontra como única fonte de nitrogênio em condições microaerófilas (DÖBEREINER, 1992b). Entre as BDNS mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Estudos consideram bactérias do gênero *Azospirillum* como sendo capazes de colonizar raízes de plantas não leguminosas interna e externamente (BALDANI et al., 1997a). O gênero *Herbaspirillum*, apesar de também sobreviver no solo, é comumente encontrado no interior de raízes e também na parte aérea das plantas (OLIVARES et al., 1997), assim como o gênero *Burkholderia*, que teve sua capacidade diazotrófica descoberta nas últimas décadas (GILLIS et al., 1995; BALDANI et al., 1997b). Estes microrganismos podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, pois além de incorporar nitrogênio por meio da fixação biológica, eles produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas.

A oliveira (*Olea europaea* L.) cultivada é uma árvore de tamanho médio e formato arredondado, cujo porte, densidade da copa, comprimento de entrenós e cor da madeira variam em função da variedade e de condições de cultivo (OLIVEIRA; ABRAHÃO, 2006). Um dos métodos mais utilizados atualmente para a sua propagação é através do enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização, com tratamento hormonal antes do plantio (CABALLERO; DEL RÍO, 2006). A oliveira origina-se de regiões onde o tipo climático é caracterizado por inverno chuvoso e verão seco (WALTER; BRECKLE, 1991). Sua introdução em hábitat diferente do seu original, mais especificamente no sul de Minas Gerais, região que se caracteriza por estações climáticas bem definidas, pode causar distúrbios na planta e com isso afetar seu processo de crescimento e desenvolvimento e, conseqüentemente, sua produção. Dessa forma, o uso de variedades melhoradas, associadas com técnicas de manejo desenvolvidas nas condições brasileiras, é um dos fatores que podem maximizar o processo fotossintético e, com isso, possibilitar o desenvolvimento adequado das plantas de oliveira, além de obter melhores produções

(LIVRAMENTO; OLIVEIRA, 2006). No entanto, a maioria dos estudos de oliveira no Brasil e no mundo tem sido direcionada à produção e ao manejo, e pouco relacionados aos microrganismos do solo e seus processos, sendo que os microrganismos podem contribuir para a melhoria dos processos de produção de maneira geral. O estudo da inoculação de bactérias diazotróficas não simbióticas no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira é pioneiro e de suma importância, uma vez que estes microrganismos podem auxiliar esse processo pela fixação biológica de N_2 e liberação de substâncias promotoras de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a diversidade e o potencial de utilização de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a diversidade fisiológica de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas através de testes de solubilização de fosfato, crescimento em diferentes condições de pH e temperatura, resistência a antibióticos e produção de ácido indolacético.
- ✓ Avaliar o potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira na Fazenda Experimental de Maria da Fé/MG (FEMF-EPAMIG) pela inoculação de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas, em condição de casa de vegetação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Caracterização de bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS)

Segundo Moreira e Siqueira (2006), apenas uma pequena parcela das espécies de procariotos possui a enzima nitrogenase, que é capaz de reduzir o N_2 para a forma inorgânica combinada NH_3 (amônia), disponível às plantas e outros organismos. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de nitrogênio à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio. Por mediar processos redutivos, a enzima nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, sendo necessário o desenvolvimento de mecanismos de proteção desta pelos diazotróficos aeróbios para neutralizar a incompatibilidade entre o processo de fixação de N_2 , que é estritamente anaeróbio, e seus metabolismos.

Conforme Evans e Burris (1992), pode-se caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio: as de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; as simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos; e as associativas ou não simbióticas (KENNEDY et al., 2004), que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas. De acordo com Baldani et al. (1997a), a atual função das bactérias de vida livre na associação com as gramíneas é uma questão que ainda requer esclarecimento. Entre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, a simbiose rizóbio-leguminosas tornou-se o sistema mais especializado, sendo responsável por 22% de todo nitrogênio incorporado ao ecossistema terrestre (PEOPLES et al., 1995). Um dos grandes interesses dos pesquisadores é a extensão desses processos biológicos para outras culturas, como gramíneas e cereais, principalmente as de grande importância sócio-econômica (SALA, 2002). Dessa forma, a fixação biológica associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de nitrogênio possa ser suprida (FRANCO; DÖBEREINER, 1994).

Até a década de 70, o conceito básico de BDNS aeróbias somente incluía bactérias capazes de crescerem em placas sob concentrações de O_2 do ar. Devido à sensibilidade extrema da nitrogenase ao O_2 , estes organismos desenvolveram o mecanismo conhecido como proteção respiratória, isto é, respiração extremamente elevada para escoar o O_2 do sítio da enzima nitrogenase. Observações pioneiras de Döbereiner e Day (1976), de que o

uso de meios sem nitrogênio e de consistência semi-sólida eram a condição ideal para o crescimento desses diazotróficos, permitiram a utilização extensiva desse método no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores associados a diferentes plantas e condições de clima e solo. Segundo Döbereiner (1992b), estes diazotróficos, apesar de serem aeróbios, apenas conseguem fixar o N_2 e crescer com este como única fonte de nitrogênio em condições microaerófilas, isto é, onde há concentração de oxigênio suficiente para a sua respiração, sem, no entanto, haver acúmulo de O_2 no meio, o qual inativa a nitrogenase. Esta descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica nas associações entre diazotróficos e não-leguminosas.

Os microrganismos diazotróficos não simbióticos podem desempenhar importante papel na sustentabilidade dos ecossistemas, uma vez que incorporam nitrogênio por meio da fixação biológica e produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO; OKON, 2000). No entanto, Bashan e Holguin (1997) relataram que a ocorrência e a atividade destas bactérias no solo e na planta são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes e carbono) e biológicos (espécie vegetal não-hospedeira).

As bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas podem ser rizosféricas, facultativas ou obrigatórias (BALDANI et al., 1997a). Na primeira categoria estão todas as espécies que colonizam as raízes apenas superficialmente. Os microrganismos facultativos são aqueles capazes de colonizar raízes interna (endofíticas) e externamente (epifíticas) e, o terceiro grupo, os que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea das plantas não-leguminosas. Neste estudo serão enfatizadas as BDNS pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

Gênero Azospirillum

Estudos relatam *Azospirillum* spp. como sendo o grupo mais promissor associado a gramíneas e não-leguminosas, devido sua capacidade de colonizar todo o interior da planta, localizando-se dentro de habitats protegidos do oxigênio (BALDANI et al., 1997a). Segundo Bashan e Holguin (1997) são considerados diazotróficos facultativos, pois, além de colonizarem os hospedeiros, podem sobreviver no solo na forma de cistos. As bactérias do gênero *Azospirillum* foram identificadas inicialmente como *Spirillum lipoferum* por

Döbereiner e Day (1976), isoladas a partir de raízes de *Digitaria*. Posteriormente, foi proposto o gênero *Azospirillum* com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense* com base em diferenças morfológicas, fisiológicas e também através de homologia de DNA entre os isolados analisados. Atualmente, outras espécies foram descritas como *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), isolada de gramíneas forrageiras e pupunha nativa da região amazônica, *A. halopraeferans* (REINHOLD et al., 1987), isoladas de gramíneas do Paquistão, *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989) isolada de plantas de arroz no Iraque e *A. largomobile* (DEKHIL et al., 1997). Das seis espécies, *A. lipoferum* e *A. brasilense* são as mais estudadas, ocorrendo em grande abundância, principalmente em regiões tropicais em associações com gramíneas forrageiras, milho, trigo, arroz e sorgo.

Azospirillum spp. pode ser caracterizado como bactéria Gram-negativa, tipo bastonete, bastante móvel, com 0,8 a 1 µm de diâmetro, 2 a 4 µm de comprimento, com grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato (DÖBEREINER et al., 1995). São aeróbios típicos, quando supridos com fonte de nitrogênio combinado, e microaerofílicos, quando crescem dependentes da fixação de N₂. O poli-hidroxibutirato (PHB) serve como uma maneira de armazenar dentro da célula materiais que podem servir de reserva para obtenção de carbono e como fonte de energia para o caso de ausência de um destes (COUTINHO et al., 2004).

Em meio semi-sólido sem N, bactérias do gênero *Azospirillum* spp. deslocam-se, com auxílio de flagelos, para região onde a taxa de difusão de O₂ encontra-se em equilíbrio com a taxa de respiração. Nessa faixa, formam uma película delgada em forma de véu, onde a concentração de oxigênio permite a fixação do nitrogênio para iniciar seu crescimento, movendo-se em direção à superfície, quando as células atingem número suficientemente elevado, para escoar o O₂ excessivo (DÖBEREINER et al., 1995). As espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferans* e *A. irakense* são isoladas em meio de cultura NFb semi-sólido, enquanto a espécie *A. amazonense* em meio Fam semi-sólido (MAGALHÃES, 1983).

Segundo Baldani et al. (1997a), embora várias características ecológicas e fisiológicas desses organismos estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação, estes diazotróficos, quando estão em associação com gramíneas, garantem aumentos de 5 a 30% na produção (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Gênero *Herbaspirillum*

Herbaspirillum spp. são bactérias Gram-negativas, em formato de bastonetes curvos, com diâmetro de 0,6 a 0,7 µm por 3 a 5 µm de comprimento (DÖBEREINER et al., 1995), toleram drásticas mudanças no pH (5,3 a 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986). Duas espécies do gênero são capazes de fixar N₂: *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, muito semelhantes, e que podem ser diferenciadas através do uso de algumas fontes de carbono. *H. seropedicae* tem sido isolado de um grande número de amostras de raízes, colmos e folhas de gramíneas, como milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e gramíneas forrageiras, mas não de outras famílias de plantas (OLIVARES et al., 1993). *H. rubrisubalbicans*, antiga *Pseudomonas rubrisubalbicans* (PIMENTEL et al., 1991), foi descrita como agente causal da chamada Estria Mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar plantadas nos Estados Unidos. Entretanto, campos de cana-de-açúcar no Brasil não apresentaram sintomas da doença, mostrando resistência após a inoculação artificial desta bactéria (OLIVARES et al., 1997). As duas espécies de *Herbaspirillum*, fixadoras de nitrogênio em condições microaerófilas, são isoladas em meio de cultura JNFb semi-sólido e o crescimento desse gênero é observado através de películas finas, idênticas às de *Azospirillum* spp.

Segundo Baldani et al. (1997a), *Herbaspirillum* spp. podem ser considerados diazotróficos obrigatórios, possuindo baixa sobrevivência no solo, sendo menos afetado em solos esterilizados, indicando que os fatores bióticos interferem na sua sobrevivência. No entanto, vários pesquisadores conseguiram isolar e caracterizar essas bactérias diretamente de amostras de solo (OLIVARES et al., 1996).

Gênero *Burkholderia*

Diversos estudos filogenéticos mostraram que o gênero *Pseudomonas* apresentava organismos muito distintos. Estes foram separados em cinco grupos que não se relacionavam muito bem e abrigavam espécies de outros gêneros (GILLIS et al., 1995). O grupo II incluía espécies que foram propostas como gênero *Burkholderia*.

O gênero *Burkholderia* foi criado por Yabuuchi et al. (1992), sendo a espécie *B. cepacea* escolhida como espécie tipo do gênero. Posteriormente, estudos de taxonomia revelaram que *B. cepacea* não era uma única espécie, constituindo um complexo de inúmeras novas espécies similares fenotipicamente, chamados de genomovares. Atualmente, o complexo *B. cepacea* compreende 9 genomovares (genomovar I: *B.*

cepacea; II: *B. multivorans*; III: *B. cenocepacea*; IV: *B. stabilis*; V: *B. vietnamiensis*; VI: *B. dolosa*; VII: *B. ambifaria*; VIII: *B. anthina* e IX: *B. pyrrocinia*). Desde 1992, a lista de espécies do gênero *Burkholderia* mudou diversas vezes. Atualmente, em adição aos 9 genótipos do complexo *B. cepacea*, 28 outras espécies constituem o gênero, ocorrendo comumente no solo, água, plantas, fungos, animais e humanos. Com exceção das espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, causadoras das doenças mormo em animais e melioidosis em humanos, e as espécies do complexo *B. cepacea* em pacientes com fibrose cística, a maioria das espécies aparentemente não são patogênicas (PERIN et al., 2006). Apenas cinco espécies são relatadas como patógenas de plantas: *B. cepacea* foi descrita como causadora de apodrecimento da casca de cebola nos Estados Unidos (BURKHOLDER, 1950); *B. caryophylli* é um patógeno em cravo e alho; *B. plantarii* e *B. glumae* são patógenos de arroz e *B. andropogonis* como patógeno em sorgo, feijão e cravo (COENYE; VANDAMME, 2003).

Em isolamento de bactérias diazotróficas em plantas de arroz irrigado (OLIVEIRA, 1992), plantas de mandioca (BALOTA, 1994) e, posteriormente, com o desenvolvimento do meio de cultura JMV, raízes, colmos e folhas de arroz, cana-de-açúcar e batata-doce (BALDANI, 1996), indicaram que os isolados pertenciam ao gênero *Burkholderia*. Estudos posteriores estabeleceram a grande maioria destes isolados como uma nova espécie de nome *B. brasilensis* (PERIN et al., 2006). A capacidade de alguns isolados de *B. cepacea* fixarem nitrogênio foi relatada por Bevivino et al. (1994), sendo que a primeira espécie descrita como diazotrófica foi *B. vietnamiensis*, isolada de solos cultivados com arroz no Vietnã (GILLIS et al., 1995). Alguns isolados obtidos por Estrada de Los Santos et al. (2001), levou a descrição da nova espécie diazotrófica *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), presentes na rizosfera de café e milho, raízes e colmos de milho e cana-de-açúcar, e rizosfera de cana-de-açúcar de diferentes lugares do México. *B. tropica* (REIS et al., 2004) e *B. xenovorans* (GORIS et al., 2004) foram outras espécies descritas, sendo a primeira isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, em solos dos Estados Unidos e rizosfera e raízes de milho no México; e a segunda isolada em solo contaminado com policlorinato bifenil nos Estados Unidos e associada ao café no México.

Segundo Perin et al. (2006), as bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes em inúmeras plantas e o conhecimento de sua ecologia é importante para melhor exploração e manejo do sistema.

3.2. Produção de substâncias reguladoras de crescimento por BDNS

As bactérias que se associam à planta, colonizando suas raízes, são conhecidas como rizobactérias e, além de colonizar a região do solo sob influência direta do sistema radicular, algumas também são capazes de colonizar seus tecidos internos (KOKALIS-BURELLE et al., 2006). Segundo Biswas et al. (2000), as bactérias diazotróficas são consideradas RPCP (rizobactérias promotoras de crescimento em plantas) e podem estimular o crescimento vegetal através de mecanismos diretos (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de substâncias reguladoras como ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocininas) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos, produção de antibióticos). A produção de AIA faz parte do metabolismo de muitas bactérias diazotróficas, e acredita-se que em, cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera, o AIA seja encontrado como metabólito microbiano (ZAKHAROVA et al., 1999). O AIA pode auxiliar no crescimento da parte aérea da planta e de suas raízes, aumentando a absorção de nutrientes e água (SILVA, 2010). Em concentrações muito altas a auxina inibe a alongação celular e, portanto, o crescimento do órgão (MARCHIORO, 2005).

Existem diversas vias de biossíntese para produção de AIA em plantas e microrganismos, havendo as que são dependentes do L-triptofano e as vias que são independentes desse aminoácido que podem ocorrer através de precursores como 3-indolacetamida, ácido 3-indolpirúvico e 3-indolacetonitrilo (PATTEN; GLICK, 1996). Alguns autores sugerem que 90% do ácido indolacético sintetizado pelo gênero *Azospirillum* é derivado de uma via independente da adição de triptofano ao meio de cultura, pois outros compostos podem ser metabolizados (ZAKHAROVA et al., 1999). Halda-Alija (2003) verificou que houve produção de AIA pelos isolados de bactérias diazotróficas mesmo quando não houve adição de triptofano ao meio de cultura.

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias dizotróficas ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos. Além da interação entre o genótipo da planta e a comunidade promotora de crescimento, outros fatores interagem neste processo, como as comunidades microbianas endofíticas, epifíticas e rizosféricas (PEDRINHO, 2009).

Processos de identificação e seleção de microrganismos capazes de produzir substâncias reguladoras de crescimento são frequentemente utilizados em laboratórios, sendo comumente realizado o método colorimétrico onde a concentração dos compostos

indólicos é estimada com uma curva padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido indolacético comercial (BRIC et al., 1991; KUSS et al., 2007).

3.3. Inoculação de BDNS para o crescimento vegetal

Das BDNS, o gênero *Azospirillum* foi o mais usado para produção de inoculantes comerciais ou experimentais para agricultura, embora nos últimos anos gêneros como *Herbaspirillum* e *Burkholderia* vêm ganhando destaque devido ao modo de colonização ser diferenciado, pois colonizam o tecido interno e possuem baixa sobrevivência no solo (REIS, 2007). Dentre as características que um inoculante deve ter destacam-se: o estado fisiológico da célula, o número elevado de células no produto, o número de células por semente e a longevidade do produto (VANDE BROEK et al., 2000). Estudos de Fallik e Okon (1996) e Burdman et al. (1998) foram feitos buscando-se multiplicar células de forma a melhorar a sobrevivência da bactéria nos inoculantes, mostrando que *Azospirillum* pode apresentar queda no número de células abaixo de 10^6 células por g de turfa ou mL se for líquido, após quatro meses de estocagem. Segundo Reis (2007), o ideal seria que este número se mantivesse em torno de 10^9 células por grama de veículo (turfa ou líquido) por seis meses.

Inoculantes comerciais contendo *Azospirillum brasilense* já foram lançados no mercado mundial. Nos Estados Unidos o produto Azo-GreenTM; na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, denominado Zea-NitTM que segundo os fabricantes reduz em 30 a 40% a aplicação do nitrogênio necessário a cultura. Na França foi lançado um produto a base de *Azospirillum* cujo uso com um experimento em milho na África promoveu o aumento de 100% na produção de grãos (FAGES; MULARD, 1988). Na África do Sul um inoculante de *Azospirillum* foi aplicado em 150.000 ha de milho, 12.000 ha de trigo e 500 ha de sorgo, observando efeito de 10-30% sobre o controle não inoculado durante 5 anos (DOBBELAERE et al., 2001). No México foi desenvolvido um inoculante a base *Azospirillum* chamado Fertilizante para Milho, que tem sido usado com sucesso após a aplicação em 5.000 ha em 1993 (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Na Índia várias indústrias produzem biofertilizante contendo *Azospirillum* além de outros contendo *Gluconacetobacter* para cana-de-açúcar, solubilizadores de fosfato e micorrizas. A Argentina lançou produtos contendo *Azospirillum* que visam estimular crescimento de raízes através de efeito hormonal e os fabricantes informam que o produto pode aumentar a

produção de grãos em cerca de 20% (BALDANI et al., 1999). Além disso, também se recomenda o uso de *A. brasilense* para soja, junto com *Bradyrhizobium*.

De acordo com Reis (2007), o maior obstáculo para o uso dessa tecnologia é a inconsistência de resultados em experimentos de campo, a qual está ligada a fatores como condições edafoclimáticas e interações com a biota do solo. Outro fator impeditivo está relacionado ao estabelecimento de um programa de seleção de estirpes que deve ser testado em vários locais e variedades, visando estabelecer as condições ideais de uso. Com isto, poder-se-ia indicar que algumas linhagens são mais susceptíveis do que outras e buscar nesse material genético o diferencial de seleção para que possa ser incorporado em novos programas de melhoramento. No Brasil, só depende de um ajuste no processo tecnológico para desenvolver um produto que atenda as necessidades da agricultura.

Em se tratando de inoculação com BDNS é consenso que estas bactérias podem promover o crescimento de diversas culturas como arroz, trigo, milho, cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1999), além de outras culturas como banana (WEBER et al., 2000), abacaxi (BALDOTTO et al., 2010), entre outras. Tal crescimento se deve, principalmente, em função da substituição parcial do N mineral (até 58% em cana de açúcar), promovendo, além de economia de fertilizantes nitrogenados, a prática de uma agricultura mais ecológica, com menores taxas de lixiviação e desnitrificação (FRANCO; BALIEIRO, 1999). A seguir são apresentados alguns estudos dos últimos dez anos (2000-2010) sobre inoculação com BDNS pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em trigo, milho, cana-de-açúcar e arroz, para evidenciar também o seu potencial de utilização na olivicultura, onde não existem estudos a respeito.

Alguns dos estudos relacionados com inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* em trigo foram feitos por Dobbelaere et al. (2002), Roesch et al. (2005), Sala et al. (2007) e Spaepen et al. (2008) onde, embora com resultados variáveis, foram obtidas respostas positivas da inoculação com relação ao crescimento das plantas e aumento do comprimento radicular.

Cavallet et al. (2000), Rolim et al. (2005), Reis Júnior et al. (2008) e Conceição et al. (2009) apresentam resultados com inoculação de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de milho, sendo verificados aumento na produtividade de grãos, matéria seca, acúmulo de N nas raízes e até aumento no comprimento das espigas.

Respostas positivas da inoculação com bactérias diazotróficas têm sido demonstradas em plantas de cana-de-açúcar crescidas sob condições de casa de vegetação e campo (OLIVEIRA et al., 2002). Canuto et al (2003), Marques Junior et al. (2008), Oliveira et al.

(2009) são outros trabalhos com inoculação dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em cana-de açúcar, com aumento de massa seca, N-total nos tecidos, aumento do tamanho populacional das bactérias no tecido radicular e até processos de competição na colonização da cana por inóculos de várias bactérias juntas.

Além da cana-de-açúcar, culturas como o arroz também tem se beneficiado da inoculação com *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, demonstrando influência positiva sobre a produtividade, acúmulo de nitrogênio e altas contribuições da fixação biológica de N na cultura (GUIMARÃES et al., 2003; MUTHUKUMARASAMY et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

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

A oliveira pertence à família Oleaceae, a qual inclui até 30 gêneros, como *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea* e *Syringa*. A espécie *Olea euopaea* L. divide-se em *Olea europaea euromediterranea*, *Olea europaea laperini* e *Olea europaea cuspidata*. Dentre as séries da subespécie *euromediterranea*, *Olea europaea euromediterranea sativa* localiza-se no Mediterrâneo e é a oliveira cultivada e difundida na América (OLIVEIRA; ABRAHÃO, 2006).

Segundo Oliveira e Abrahão (2006), a planta cultivada é uma espécie arbórea de tamanho médio e formato arredondado, cujo porte, densidade da copa, comprimento de entrenós e cor da madeira variam em função do cultivar e de condições de cultivo. É uma das plantas cultivadas mais antigas cuja origem é aceita que seja proveniente da Síria, do Líbano ou mesmo de Israel, mas há relatos que esta espécie tenha-se originado na Ásia Menor (OLIVEIRA, 2010). De acordo com Vieira Neto et al. (2008), a estimativa de área plantada de oliveira no mundo é de 8,3 milhões de hectares e a importância dessa atividade agrícola se relaciona principalmente com a produção de azeite de oliva, cujo uso moderado e habitual é considerado benéfico à saúde humana pela sua comprovada eficácia na prevenção contra doenças cardiovasculares.

A oliveira é uma planta de clima temperado, necessitando de baixas temperaturas no período que antecede a floração para ocorrência de produções satisfatórias. Conforme Oliveira e Pádua (2002), temperaturas médias de inverno entre 8 e 10°C, altitudes variáveis (200 a 1300 m) e regime de chuvas superior a 800 mm anuais são suficientes para produções econômicas. Embora as condições de temperatura e de incidência de chuvas observadas em microrregiões de Minas Gerais não apresentem características de clima

mediterrâneo, que é o mais apropriado ao cultivo de oliveiras, o sul do estado apresenta ocorrência de temperaturas suficientemente baixas para quebra de dormência das plantas, com produção de azeitonas.

Atualmente, os principais países produtores de oliveira estão na Europa, (destaque para a Espanha, Itália e Grécia). Na América do Sul, destacam-se o Chile e a Argentina como principais produtores e exportadores de azeitona e de azeite (OLIVEIRA, 2010).

Conforme Vieira Neto et al. (2008), a oliveira foi introduzida no Brasil no início do século XIX, nas regiões sul e sudeste, sendo uma espécie ainda pouco cultivada, e a maioria dos pomares existentes não são destinados à produção comercial ou industrial. O país ocupa o terceiro lugar como maior importador de azeitonas e o quinto em azeite de oliva, entre os países importadores do mundo. O cultivo de oliveiras em áreas agrícolas, especialmente Minas Gerais, é uma atividade econômica em expansão, devido à inexistência de plantios comerciais em produção em território nacional, e pelo fato de que o Brasil importa todo o azeite e azeitona que consome. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, em 2008, foram gastos R\$ 463 milhões com importações desses produtos.

A oliveira apresenta duas fases bem diferenciadas: a juvenil e a adulta. Na juvenil não é capaz de produzir e apresenta maior potencial de enraizamento de estacas, folhas mais curtas e grossas e ramos em que o comprimento dos entrenós é menor. Na fase adulta apresenta capacidade reprodutora, as folhas são maiores e mais delgadas e os ramos apresentam entrenós com maiores comprimentos (RAPOPORT, 1998). A inflorescência da oliveira é em racimo, com a flor constituída por quatro sépalas verdes soldadas, que formam um cálice com quatro pétalas brancas, que também se soldam pela base para formar a corola (OLIVEIRA; ABRAHÃO, 2006). O fruto conhecido como azeitona é uma drupa de tamanho pequeno e forma elipsoidal, cujas dimensões podem variar de acordo com a variedade, podendo apresentar entre 1 e 4 cm de comprimento e diâmetro de 0,6 a 2 cm, e coloração variando de verde a preta (OLIVEIRA et al., 2007).

O sistema radicular varia em função da origem da árvore, se originado de sementes ou de estacas, e dos atributos do solo sobre o qual está sendo cultivada. A semente origina um sistema radicular caracterizado por uma raiz pivotante central (LOUSSERT; BROUSSE, 1980). Em árvore obtida a partir de estaqueamento forma-se um sistema radicular fasciculado. A maioria destas raízes adventícias se comporta como raízes principais durante o desenvolvimento e crescimento da árvore (RAPOPORT, 1998). Essa densidade e configuração das raízes têm papel importante no estabelecimento e atividade de

microrganismos, com forte influência na rizosfera dos cultivares. Ambas as técnicas de propagação apresentam desvantagens, no caso da semente por requerer um tempo excessivamente mais longo na fase inicial e por poder originar espécies diferenciadas da planta mãe. O estaqueamento pelo método tradicional só pode ser feito uma vez por ano, durante a época da poda, terminada a colheita e antes da saída do repouso invernal. Atualmente, a oliveira é propagada através do enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização, o que permite produzir mudas de melhor qualidade e em quantidade suficiente para atender à demanda da moderna olivicultura (CABALLERO; DEL RÍO, 2006).

3.5. Propagação de oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas

A reprodução sexual não é desejada no estabelecimento de plantios comerciais de oliveira, mesmo possuindo frutos com sementes viáveis, em razão das plantas obtidas serem distintas da planta-mãe e apresentarem longo período juvenil. Assim, a propagação vegetativa vem a ser a técnica mais viável para o processo de formação de mudas de plantas frutíferas, de forma a manter as características genéticas das plantas-matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção (FACHINELLO et al., 1995; HARTMANN et al., 2002; PASQUAL et al., 2001). Segundo Jacoboni et al. (1976) e Oliveira (2001), a propagação por enxertia é limitada no caso de oliveira pela falta de estudos sobre a melhor combinação entre enxerto/porta-enxerto, tanto do mesmo gênero como gêneros afins, sendo a estaquia a forma mais utilizada no processo propagativo dessa cultura.

A estaquia é um método de propagação muito utilizado, sendo sua viabilidade dependente da capacidade de formação de raízes, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada por esse método na área de produção (PIO et al., 2005). Lorenzi et al. (2006) classificam as estacas em: herbáceas, estacas obtidas das pontas dos ramos não amadurecidos, bem tenros, com período ideal de estaquia durante a primavera e verão, onde ocorre maior crescimento vegetativo antes dos ramos se tornarem lenhosos; semilenhosas, estacas com folhas e maior consistência lenhosa que as herbáceas, melhor período de estaquia no final do verão e início do outono; lenhosas, obtidas de ramos lenhosos no inverno, período de dormência das plantas. O principal método de propagação da oliveira é a estaquia obtida de ramos semilenhosos (OLIVEIRA et al., 2008).

Os fatores que afetam o enraizamento podem ser fatores internos ou endógenos, considerando, principalmente, as condições fisiológicas e idade da planta-matriz, época de coleta da estaca, potencial genético de enraizamento, sanidade, balanço hormonal, oxidação de compostos fenólicos e posição da estaca no ramo; e fatores externos ou exógenos, como a temperatura, luz, umidade e substrato (FACHINELLO et al., 1995). Os fatores endógenos constituem um dos mais sérios problemas, sendo importante a busca de técnicas auxiliares, como o uso de reguladores de crescimento, para assim proporcionar uma melhoria do enraizamento (BIASI, 1996; MAYER, 2001). O grupo de reguladores de crescimento usado com maior frequência na indução de enraizamento é o das auxinas (HINOJOSA, 2000). É necessário que haja um balanço hormonal entre promotores e inibidores do processo de iniciação radicular. A maneira mais comum de promover esse equilíbrio é pela aplicação exógena de reguladores de crescimento sintéticos, como o ácido indolbutírico (AIB), que podem elevar o teor de auxina no tecido (PASQUAL et al., 2001).

O processo de estaquia, aliado à aplicação de hormônios enraizadores e técnicas de nebulização intermitente, tornou-se de grande importância na fruticultura comercial nacional, como em goiaba, carambola, acerola, figo, e até frutíferas de difícil enraizamento como a Lichia, que vem apresentando resultados positivos no enraizamento (LORENZI et al., 2006). Porém, os resultados encontrados na literatura com relação à oliveira não são muito satisfatórios, como em Oliveira (2001), que obteve 44,28% de estacas enraizadas do cultivar Ascolano 315, quando coletadas no mês de fevereiro, e 16,64% de enraizamento no mês de abril; e Sebastiani e Tognetti (2004), trabalhando com o enraizamento de estacas das oliveiras Frantoio e Gentile di Larino, concluíram que esses cultivares apresentam baixo enraizamento, mesmo utilizando 4 g L⁻¹ de AIB, valor máximo aplicável, segundo Vieira Neto et al. (2008).

O sistema de multiplicação de oliveira através do enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização consta de três fases distintas (CABALLERO, 1981; OLIVEIRA, 2001; CABALLERO; DEL RÍO, 2004): enraizamento, emissão de raízes adventícias na base das estacas; aclimatação, funcionamento do sistema radicular obtido no enraizamento; e formação de mudas em viveiro, obtenção de plantas em sacolas de polietileno formadas com um só caule. Neste projeto de dissertação será dada ênfase ao processo de enraizamento em estacas semilenhosas de oliveira.

O sucesso do enraizamento em estacas semilenhosas de oliveira depende da variedade e também da qualidade do material vegetativo utilizado para preparar este propágulo (CABALLERO, 1981; OLIVEIRA, 2001; CABALLERO; DEL RÍO, 2004; DEL RÍO;

CABALLERO, 2005). Para um excelente enraizamento, as estacas devem ser preparadas a partir de ramos colhidos de matrizes de oliveiras cultivadas especialmente com o objetivo de estaquia. O enraizamento é menor quando as estacas são provenientes de ramos de oliveira em produção, diminuindo ainda mais quando se utilizam ramos com flores ou frutos (DEL RÍO et al., 1991). Segundo Oliveira et al. (2008), normalmente utilizam-se estacas de 12 a 15 cm de comprimento, com número de entrenós variável, dependendo principalmente da variedade, e dois a três pares de folhas na parte apical. Após ser retirado da planta-matriz, o material vegetal deve ser mantido fresco e úmido até que as estacas sejam preparadas. O tratamento hormonal antes do plantio das estacas é imprescindível para melhorar o enraizamento (CABALLERO, 1981), sendo que o mais utilizado em oliveira, assim como em outras frutíferas, é a imersão da base das estacas em solução de AIB (diluída em álcool etílico e água 50%, e concentração de 3 a 4 g L⁻¹). Segundo Caballero e Del Río (2006), o tratamento hormonal produz resultado eficaz na maioria das variações testadas, sendo pouco efetivo naquelas de difícil enraizamento devido à presença de substâncias inibidoras. Posteriormente, as estacas são plantadas em bancadas de propagação a uma profundidade de 4 a 5 cm, sendo a perlita agrícola o substrato mais utilizado por ser inerte, possuir capacidade de manter seu volume após irrigação e ter boa drenagem (OLIVEIRA et al., 2008). Estes mesmos autores comentam que o aquecimento do substrato com temperaturas entre 20-25°C e ambiente fresco e úmido ao redor das estacas, sendo imprescindível a nebulização intermitente, são requisitos fundamentais para que o enraizamento ocorra.

Apesar do potencial biotecnológico de promoção de crescimento, não há estudos de inoculação de bactérias diazotróficas não simbióticas em oliveira, desconhecendo-se o papel desempenhado por esse grupo de microrganismos nesta cultura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos isolados de BDNS

Silva e Melloni (2011) avaliaram a densidade e diversidade fenotípica (baseada em características fenotípicas culturais de cor, diâmetro e consistência das colônias, e teste de tolerância à salinidade) de isolados de BDNS, em solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos e entorno, em duas épocas contrastantes (setembro/2006 e abril/2007).

As áreas estudadas por esses autores compreendiam três áreas no interior da reserva e uma área no entorno da mesma, sob ação antropogênica, para confronto dos resultados. A descrição das áreas (Figura 4.1) são: Área 1: área em relevo suave a suave ondulado, 0,1296 m m⁻¹ de declive (22°25'48,8" Sul e 45°22'18,3" Oeste) e altitude de 1311 m; Área 2: área em relevo ondulado, declive de 0,3534 m m⁻¹ (22°25'33,3" Sul e 45°22'20,9" Oeste) e altitude de 1306 m; Área 3: área em relevo montanhoso, 0,5609 m m⁻¹ de declive (22°25'45,5" Sul e 45°22'17,0" Oeste) e altitude de 1307 m; Área 4: área de média a baixa declividade, localizada fora da reserva (22°25'28,2" Sul e 45°22'15,0" Oeste), com altitude de 1307 m onde se pode observar a presença de gado e vegetação de campo (pasto abandonado em sucessão, com domínio de braquiária (*Brachiaria* spp.)). A cobertura vegetal original é representada pelo contato Floresta Ombrófila Densa/Floresta Ombrófila Mista, sendo atualmente a maior parte composta por vegetação secundária (PREFEITURA MUNICIPAL DE ITAJUBÁ, 2002).

Para as duas épocas estudadas, foram feitos dendrogramas de similaridade construídos com as características fenotípicas culturais (cor, tamanho e consistência de colônias) de isolados e estirpes-tipo de BDNS. As estirpes-tipo utilizadas foram *Azospirillum brasilense* (BR 11001), *Azospirillum lipoferum* (BR 11080), *Azospirillum amazonense* (BR 11040), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340). A análise da coerência taxonômica entre os grupos culturais dos isolados e as estirpes-tipo foi feita em 70% de similaridade nos dendrogramas. Desses grupos, 52 isolados (cerca de 30% do total) das amostras de setembro/2006 e 95 isolados (cerca de 55% do total) das amostras de abril/2007 apresentaram semelhança fenotípica cultural com as estirpes-tipo, evidenciando uma alta diversidade fenotípica dos isolados.



Figura 4.1. Vista das áreas estudadas em Silva e Melloni (2011): áreas no interior da reserva (Áreas 1, 2 e 3, respectivamente a, b e c) e área no entorno da reserva (Área 4, d)

4.2. Teste de viabilidade dos isolados em meios de cultura específicos

Todos os isolados de bactérias que apresentaram 70% de similaridade com as estirpes-tipo, tanto nas coletas de setembro/2006 como abril/2007, no estudo de Silva e Melloni (2011) foram submetidos ao teste de viabilidade.

Neste teste, porções dos isolados que estavam devidamente numerados e armazenados em tubos *ependorf*, em meio batata sólido (DÖBEREINER et. al., 1995), foram riscadas em miniplacas de Petri contendo meios de cultura específicos com consistência sólida, as quais foram incubadas em estufa a 28°C durante cinco dias (Figura 4.2). Os meios usados foram os de origem de cada isolado, sendo NFb para *Azospirillum* spp. e JNFb para *Herbaspirillum* spp., conforme descrito em Döbereiner et. al (1995), e o meio Fam para *Azospirillum amazonense*, descrito em Magalhães (1983).

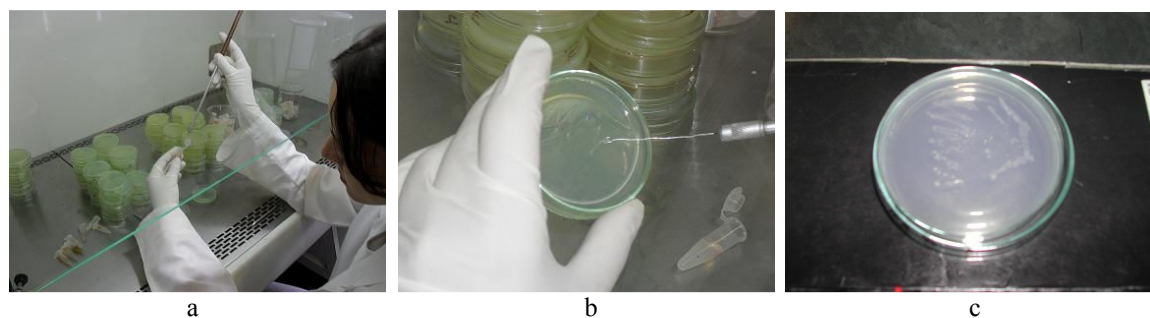


Figura 4.2. Riscagem em meio de cultura sólido: transferência do isolado do tubo *ependorf* (a), riscagem em miniplaca de Petri contendo meio sólido específico (NFb, JNFb ou Fam) (b), e crescimento das colônias (c)

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 sete dias a 28°C, conforme Melloni et al. (2004). A repicagem para o meio semi-sólido é mostrada na Figura 4.3.

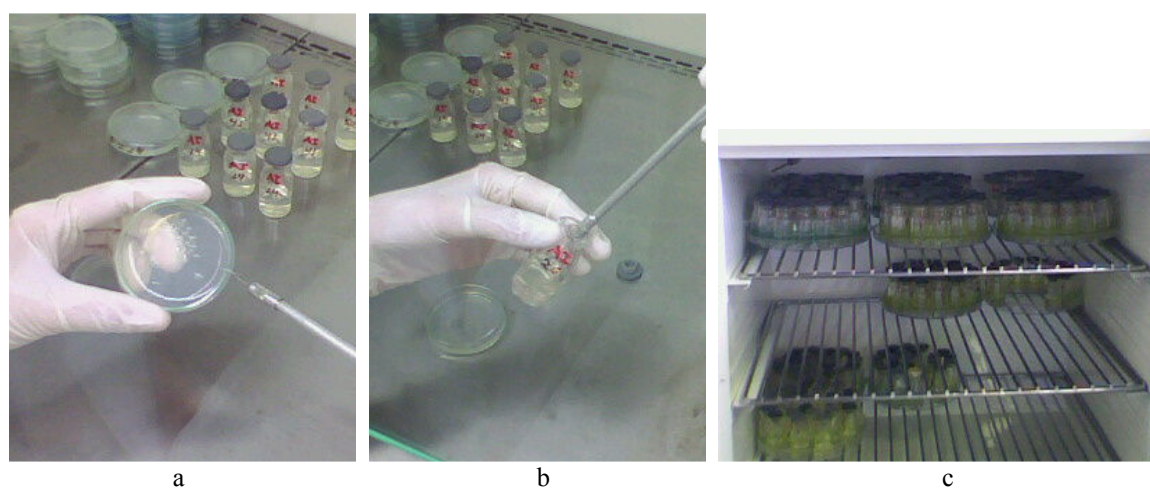


Figura 4.3. Repicagem em meio de cultura semi-sólido: transferência de uma colônia isolada do meio sólido (a) para o fundo do mesmo meio, porém de consistência semi-sólida (b), e incubação dos frascos contendo meio semi-sólido em estufa (c)

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 4.4).

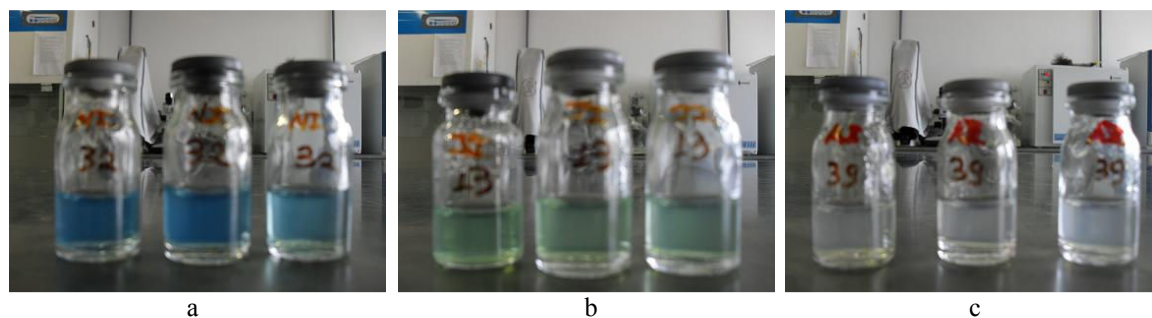


Figura 4.4. Crescimento das colônias em meio de cultura semi-sólido: triplicata de isolados nos meios NFb (a), JNFb (b) e Fam (c)

4.3. Seleção dos isolados a serem estudados

Dos isolados que apresentaram crescimento (item 4.2), tanto para a coleta de setembro/2006 quanto para abril/2007, em vista do grande número de isolados obtidos, optou-se por selecionar os que apresentaram viabilidade nas amostras de solo coletadas em setembro/2006, ou seja, 17 isolados. A utilização de isolados obtidos nessa época de amostragem (inverno) se deve ao fato da temperatura média na reserva (16°C, segundo CPTEC, 2011) ser semelhante àquela de Maria da Fé (MG), onde o experimento com oliveiras, em casa de vegetação, foi conduzido. Dessa forma, considerou-se importante padronizar aspectos ambientais/ecológicos dos isolados e da oliveira, principalmente relacionados à altitude (acima de 1250 m), temperatura e proximidade espacial.

4.4. Distribuição dos grupos de BDNS e estirpes-tipo estudadas

Os isolados selecionados para o estudo foram distribuídos em 5 grupos (G1 a G5), sendo dois grupos com 4 isolados e três grupos com 3 isolados, conforme Tabela 4.1. A distribuição foi feita enquadrando-se isolados que se encontravam dentro de um mesmo grande grupo no dendrograma de similaridade em Silva e Melloni (2011). As estirpes-tipo utilizadas neste estudo foram *Azospirillum brasilense* (BR 11001), *Azospirillum amazonense* (BR 11040), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340), provenientes da Embrapa-Seropédica, RJ.

Tabela 4.1. Distribuição dos isolados selecionados em grupos

Número do isolado	Meio de cultura de origem	Área de origem	Grupo
8	JNFb	1	G1
13	JNFb	1	
14	Fam	3	
16	NFb	4	
17	JNFb	1	G2
26	Fam	3	
38	JNFb	4	
39	Fam	1	
30	JNFb	1	G3
31	JNFb	4	
32	NFb	1	
33	NFb	1	G4
42	NFb	4	
43	NFb	4	
47	NFb	4	G5
48	NFb	4	
50	NFb	4	

4.5. Crescimento individual dos isolados e das estirpes-tipo

A técnica de crescimento bacteriano foi feita conforme Baldotto et al. (2010) com modificações. Porções das colônias dos tubos *ependorf* dos isolados bacterianos selecionados e das estirpes-tipo foram transferidas para erlenmeyers contendo meio líquido Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986) e submetidos à agitação em temperatura ambiente 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 4.5. O crescimento individual foi utilizado nos testes de diversidade fisiológica e para o preparo dos inóculos.

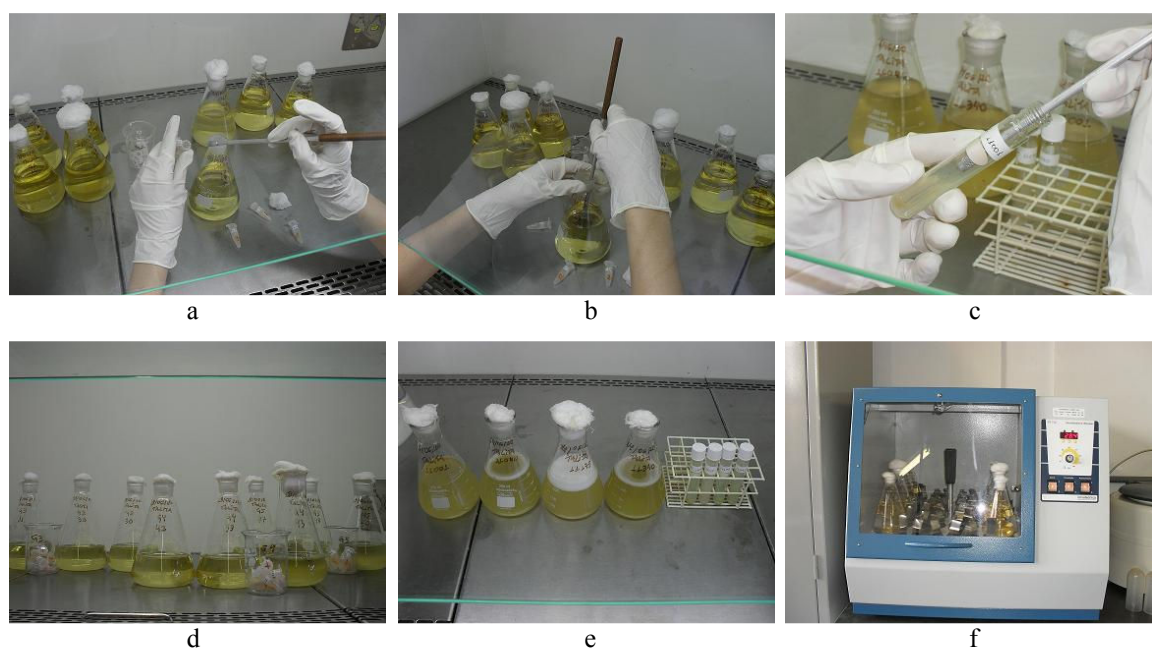


Figura 4.5. Crescimento bacteriano: transferência de porção da colônia do isolado em tubo *ependorf* (a) para o meio líquido Dygs em erlenmeyer (b), transferência de porção da estirpe-tipo (c), vista geral de erlenmeyers contendo meio líquido com os isolados (d), vista geral das estirpes-tipo em meio líquido (e), e agitação em temperatura ambiente (f)

4.6. Preparo dos inóculos dos grupos de bactérias

Após o crescimento das bactérias, os inóculos dos grupos G1 e G2 foram preparados adicionando-se 50 mL de cada isolado respectivo ao grupo, enquanto que os grupos G3, G4 e G5 foram preparados com 67 mL de cada isolado, obtendo-se suspensões de 200 mL para cada grupo. Antes de cada adição, cada suspensão contendo um isolado foi agitada e homogeneizada. A preparação dos inóculos referentes aos grupos de bactérias é apresentada na Figura 4.6. Os inóculos dos grupos foram utilizados na avaliação do potencial de enraizamento em estacas semilenhosas de oliveira.

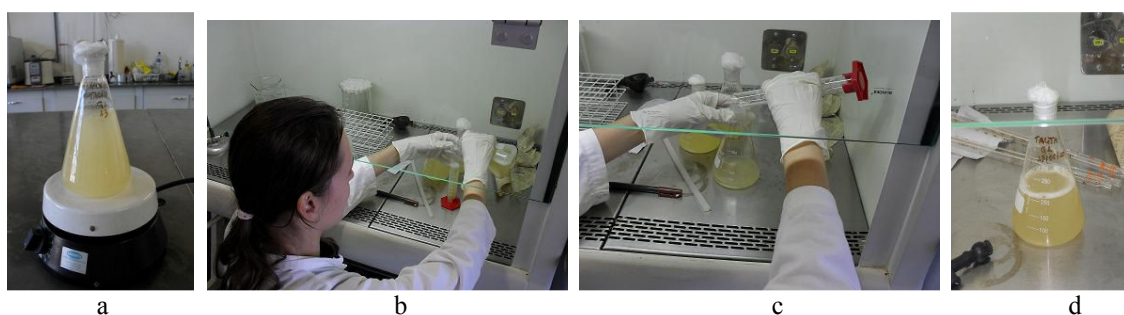


Figura 4.6. Preparo dos inóculos dos grupos de bactérias: isolado sendo agitado (a), medindo-se o respectivo volume do isolado (b) a ser adicionado ao grupo (c) e vista do grupo montado com todas as adições (d)

4.7. Avaliação da densidade bacteriana

De todos os isolados, grupos e estirpes-tipo foram retirados 10 mL de suspensão de cada meio, os quais foram anteriormente agitados e colocados em tubos de ensaio (Figura 4.7), que foram armazenados sob refrigeração a fim de se fazer a avaliação da densidade bacteriana e os testes de diversidade fisiológica dos isolados e estirpes.

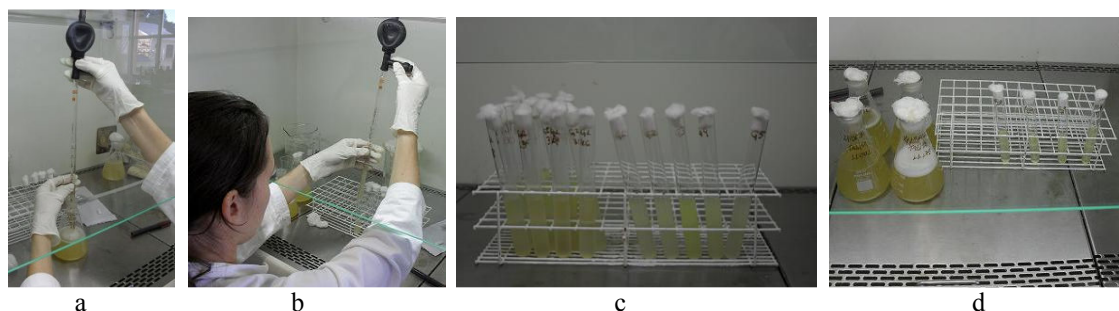


Figura 4.7. Retirada de suspensão de cada meio líquido: tirando 10 mL de suspensão (a) e passando para o tubo de ensaio (b), vista geral dos tubos contendo suspensões dos isolados e grupos (c) e vista dos tubos com suspensões das estirpes-tipo

A partir das suspensões dos tubos, diluições sucessivas foram realizadas (Figura 4.8) onde se coletava 1 mL da diluição anterior e o colocava em 9 mL de solução salina (0,85%), indo desde a diluição 10^{-1} até a diluição de 10^{-7} . Todos os tubos foram submetidos à agitação, proporcionando a diluição desejada.

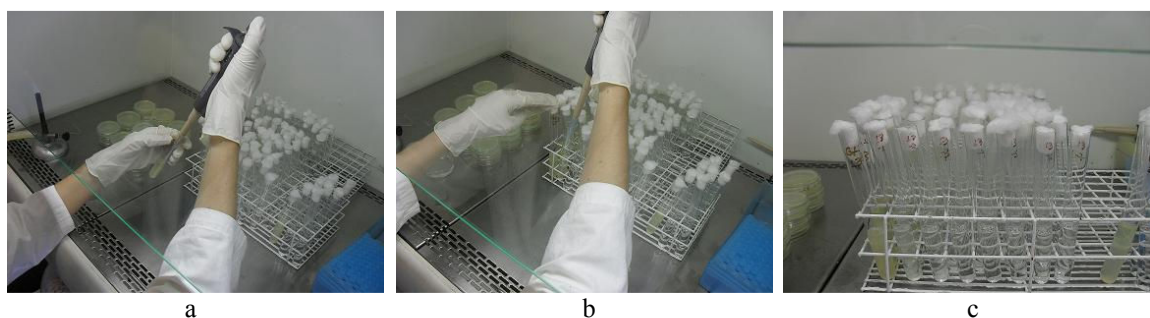


Figura 4.8. Preparo das diluições com suspensão de bactéria: coletando-se 1 mL do tubo, devidamente agitado, contendo suspensão de bactéria (a) e passando para a primeira diluição 10^{-1} (b), e diluições feitas até 10^{-7} (c)

Para a avaliação da densidade bacteriana, 0,1 mL das diluições 10^{-5} a 10^{-7} foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Dygs sólido, processo em triplicata, e espalhadas com alça de *Drigalsky* (Figura 4.9). A alça era passada em álcool e flambada a cada espalhamento, e cada tubo de ensaio devidamente agitado antes da inoculação. As placas foram incubadas a 28°C por três dias.

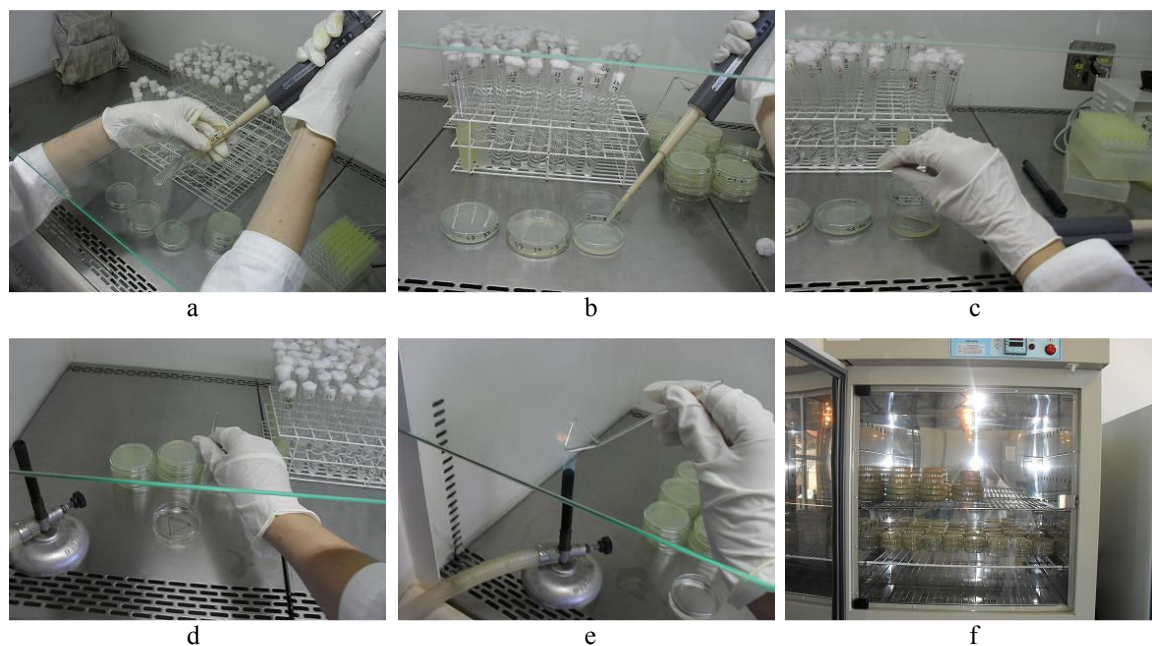


Figura 4.9. Inoculação para avaliação da densidade bacteriana: 0,1 mL sendo coletados do tubo de ensaio com suspensão bacteriana (a) e passados à placa de Petri (b), espalhamento com alça de *Drigalsky* (c), alça sendo passado no álcool (d) e flambada (e) a cada espalhamento, e incubação das placas (f)

Para a análise da densidade bacteriana, inicialmente fez-se o teste utilizando placas de Petri tamanho médio (diâmetro de 9 cm) e miniplacas (diâmetro 4 de cm), e avaliou-se o crescimento nas mesmas diluições, para o mesmo isolado, em ambas as placas. Este processo também foi realizado em triplicata (Figura 4.10). As miniplacas mostraram melhor distribuição e facilidade para a metodologia de avaliação da densidade bacteriana e foram as utilizadas para a avaliação nos demais isolados, grupos e estirpes-tipo.

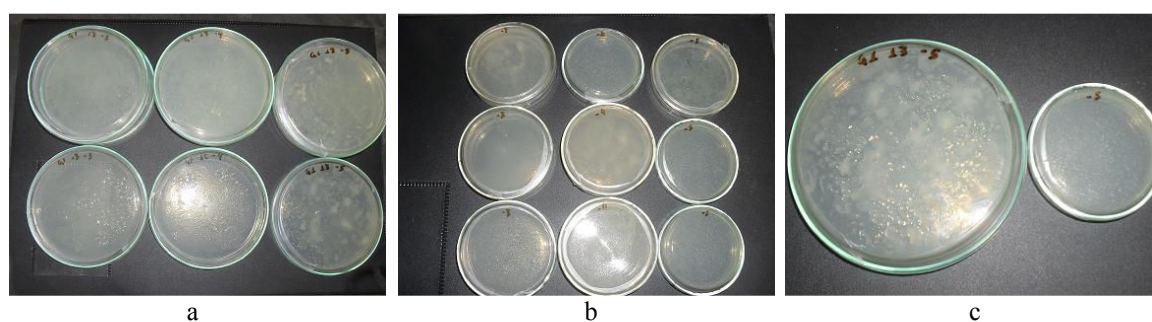


Figura 4.10. Densidade bacteriana em placas de Petri de diferentes tamanhos: crescimento nas diluições 10^{-5} a 10^{-7} , em triplicata, para o mesmo isolado, em placa de Petri tamanho médio (a) e miniplaca (b), e comparação entre as duas placas (c)

Após o crescimento, selecionou-se a diluição com crescimento mais adequado para a contagem (acima de 20 e abaixo de 200 colônias), realizando-se a contagem das colônias para cada triplicata a fim de se ter uma média do número de colônias (Figura 4.11).

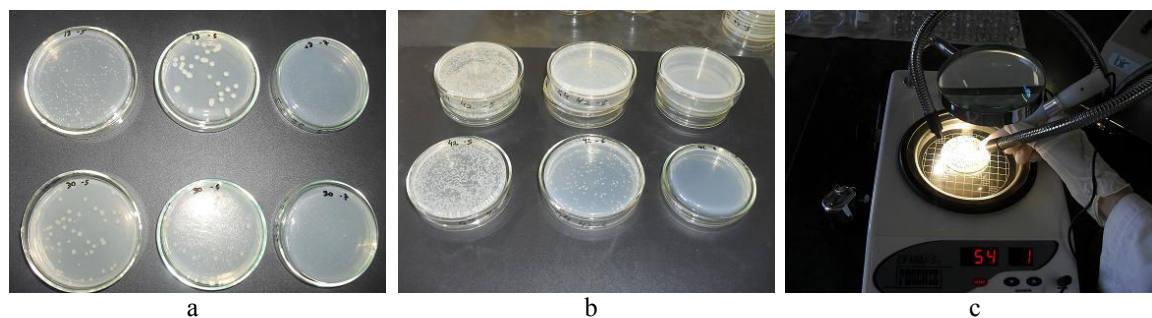


Figura 4.11. Crescimento e contagem de colônias: crescimento nos isolados 13 e 30 (a) e 42 (b) nas diluições analisadas, e contagem de colônias na triplicata da diluição com crescimento adequado (c)

O total de unidades formadoras de colônias (UFC) dos isolados de bactérias selecionados, dos grupos de inóculos formados e das estirpes-tipo estudadas encontram-se na Tabela 4.2. Os isolados, estirpes-tipo e grupos de bactérias apresentaram valores de densidade bacteriana na ordem de 10^8 , valor considerado próximo ao do ideal considerado por Reis (2007) e dos inoculantes comerciais de rizóbio (diazotrófica simbiótica) no Brasil (DERNARDIN, 2007), com concentração de 10^9 células g^{-1} ou mL^{-1} de inoculante.

4.8. Testes de diversidade fisiológica dos isolados e estirpes-tipo de BDNS

a. Solubilização de fosfato

Alíquotas de 2 μL das suspensões bacterianas (BALDOTTO et al., 2010) dos isolados e estirpes-tipo de BDNS foram colocadas em miniplacas de Petri contendo meio de cultura GES sólido (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). O experimento foi realizado em triplicata (Figura 4.12). A formação do halo translúcido que se forma em torno de colônias bacterianas solubilizadoras foi considerada como resultado positivo (MEHNAZ et al., 2010).

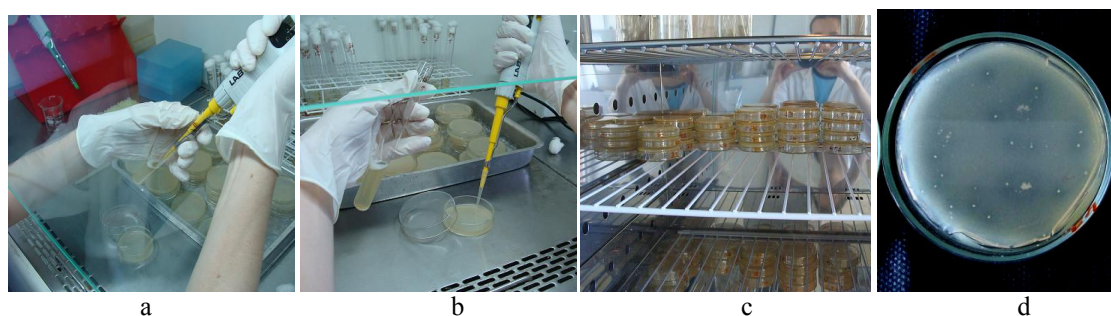


Figura 4.12. Solubilização de fosfato: retirando alíquotas de 2 μL de solução bacteriana (a) e colocando em miniplaca contendo meio para análise de solubilização de fosfato (b), incubação (c) e miniplaca contendo colônias com formação do halo translúcido (d)

Tabela 4.2. Densidade bacteriana nos isolados, estirpes-tipo e grupos formados

Agrupamento	Número do isolado / estirpes-tipo/ grupos	UFC 10 ⁸ mL ⁻¹
G1	8	1,87
	13	6,50
	14	4,40
	16	4,40
G2	17	4,50
	26	8,90
	38	1,49
	39	5,70
G3	30	0,72
	31	2,60
	32	11,27
G4	33	1,49
	42	17,20
	43	4,53
G5	47	16,35
	48	4,10
	50	1,87
Estirpes-tipo	<i>Azospirillum brasilense</i>	0,38
	<i>Azospirillum amazonense</i>	0,35
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	0,33
	<i>Burkholderia brasilensis</i>	0,56
Grupos	G1	11,90
	G2	7,80
	G3	6,00
	G4	9,57
	G5	3,77

b. Crescimento em diferentes condições de pH

De acordo com Florentino et al. (2010), alíquotas de 0,1 mL das suspensões bacterianas dos isolados e estirpes-tipo foram inoculadas em miniplacas de Petri contendo meio Dygs sólido e espalhadas com alça de *Drigalsky*. O meio Dygs teve as condições de pH alteradas pela adição de NaOH ou HCl a fim de se obter os seguintes valores: 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (WEI et al., 2008). O controle foi feito utilizando meio Dygs com pH 6,4. Todo o processo de inoculação foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 28°C por três dias (Figura 4.13).

A tolerância às condições de pH foi observada através da porcentagem de crescimento bacteriano em relação a área superficial do meio de cultura. Como o experimento foi feito em triplicata, a média destas representa a porcentagem de crescimento para o isolado/estirpe-tipo em estudo em determinada condição de pH. Assim como o proposto em Trannin et al. (2001), foram atribuídos valores às médias dos percentuais de crescimento, para cada condição de pH, sendo estes: 0 (ausência de crescimento), 1 (1-19%), 2 (20-39%), 3 (40-59%), 4 (60-79%) e 5 (80-100%). Para avaliação da faixa ótima de crescimento bacteriano por grupo, considerou-se o somatório das notas atribuídas para cada valor de pH. Valor igual ou acima de 85% do somatório total das notas foi considerado condição ótima para crescimento.

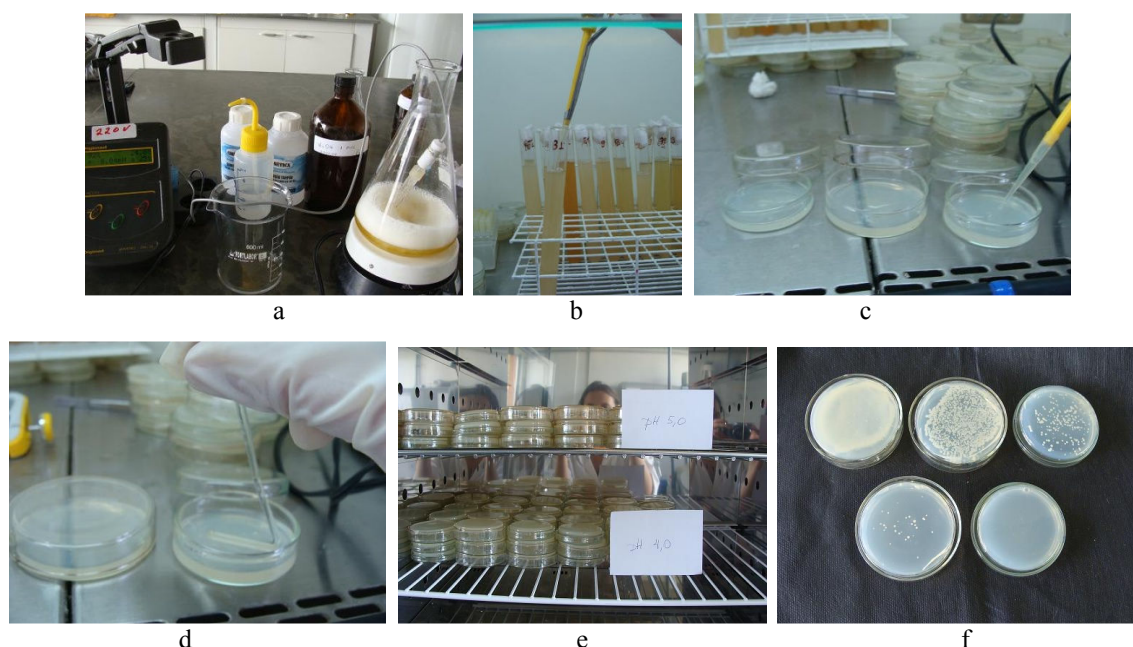


Figura 4.13. Tolerância a diferentes pH's: preparo do meio Dygs com pH específico (a), retirando alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana (b) e colocando em miniplaca contendo meio Dygs sólido com determinado pH (c), espalhando com alça de *Drigalsky* (d), armazenamento em estufa (e) e crescimento bacteriano de determinados isolados em relação a um mesmo pH (f)

c. Crescimento em diferentes condições de temperatura

O procedimento e a avaliação da porcentagem de crescimento foram os mesmos realizados com os diferentes pHs (item 4.8b), com temperaturas de 10°C, 15°C e 20°C (próximas às condições da reserva e de Maria da Fé), complementares àquelas utilizadas por Florentino et al. (2010), ou seja, 35°C, 40°C e 45°C. O experimento foi realizado em triplicata, com meio Dygs sólido, incubação por três dias e o controle em temperatura de 28°C. Para avaliação do teste em baixas temperaturas (10°C, 15°C e 20°C) utilizou-se uma

câmara de germinação e para as temperaturas mais altas (35°C, 40°C e 45°C) uma estufa, conforme mostrado na Figura 4.14.

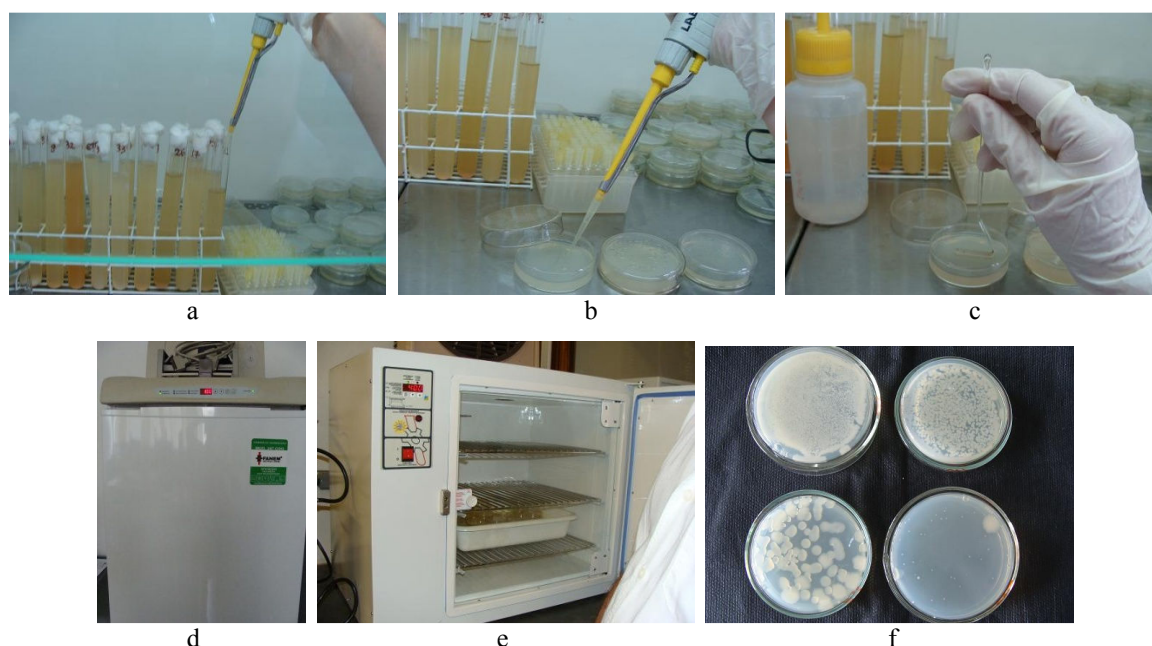


Figura 4.14. Tolerância a diferentes temperaturas: retirando alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana (a) e colocando em miniplaca contendo meio Dygs sólido (b), espalhando com alça de *Drigalsky* (c), armazenamento em câmara biológica no caso de temperaturas de 10, 15 e 20°C (d) e em estufa em temperaturas de 35, 40 e 45°C (e), e crescimento bacteriano de determinados isolados em relação a uma determinada temperatura (f)

d. Resistência a antibióticos

Alíquotas de 1 mL da suspensão dos isolados e estirpes-tipo de BDNS foram inoculadas em placas de Petri tamanho grande (diâmetro de 14 cm) contendo meio Dygs sólido e espalhadas com alça de *Drigalsky*. Dez discos de papel impregnados com antibióticos com concentrações definidas, obtidos do Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. (CECON), foram colocados em cada placa (Figura 4.15), equidistantes a fim de se observar, caso formasse, a zona de sensibilidade/inibição em torno do disco (FLORENTINO et al., 2010). Os seguintes antibióticos com as respectivas concentrações foram testados (Figura 4.16): amoxicilina (AMO) 10 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, azitromicina (AZI) 15 µg, cloranfenicol (CLO) 30 µg, eritromicina (ERI) 15 µg, estreptomicina (EST) 10 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, kanamicina (KAN) 30 µg, rifamicina (RFM) 30 µg e tetraciclina (TET) 30 µg. O experimento foi realizado em triplicata e as placas incubadas a 28°C por 24 horas (PEREIRA et al., 2003). O diâmetro do halo de inibição foi determinado com auxílio de um paquímetro.

Como o objetivo é avaliar a diversidade fisiológica, o critério adotado foi considerar a média aritmética de todos os diâmetros médios dos halos formados, independentemente do antibiótico, como critério para avaliar o potencial de resistência ou sensibilidade de cada isolado ou estirpe-tipo para cada antibiótico.

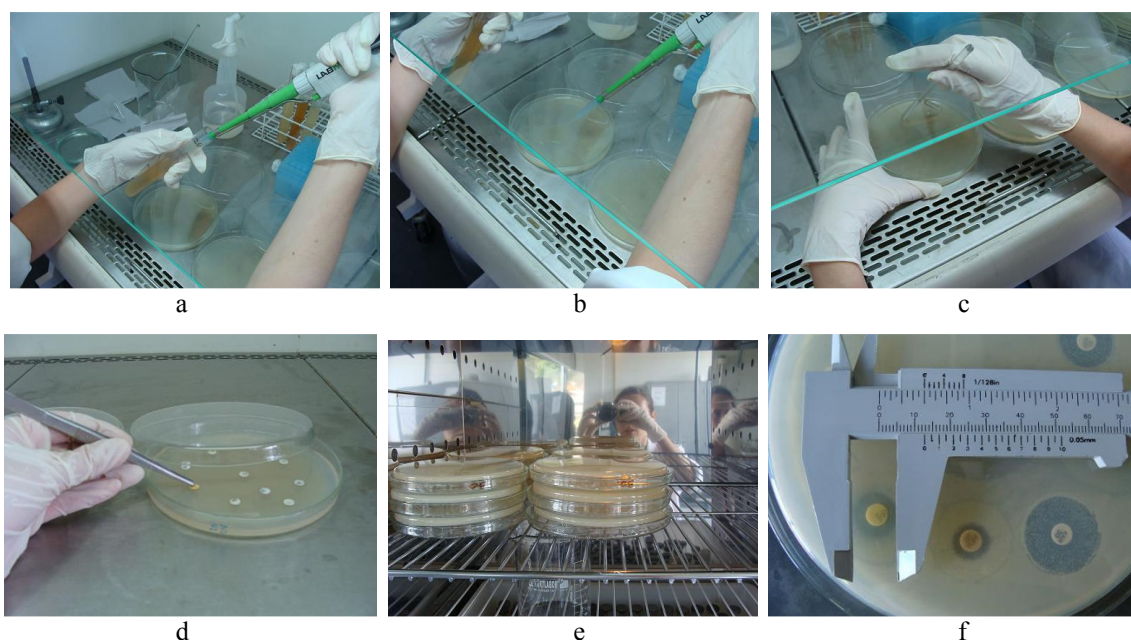


Figura 4.15. Resistência a antibióticos: retirando alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana (a) e colocando em placa de Petri grande com meio Dygs sólido (b), espalhando com alça de *Drigalsky* (c), colocando disco de antibiótico (d), incubação em estufa (e) e medição do halo formado com paquímetro (f)

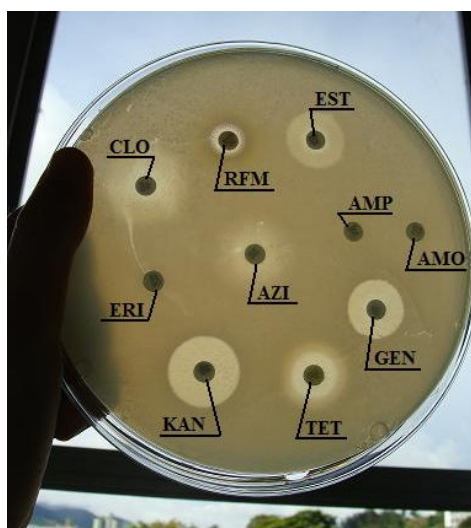


Figura 4.16. Discos de antibióticos analisados e halos formados: amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), azitromicina (AZI), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), rifamicina (RFM) e tetraciclina (TET).

e. Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico

Porções das colônias dos tubos *ependorf* dos isolados e das estirpes-tipo foram transferidas para erlenmeyers contendo meio líquido Dygs e submetidos à agitação em temperatura ambiente por três dias. Com uso do espectrofotômetro a 600 nm, foi determinada a densidade óptica (DO) de cada isolado (através dos valores de absorbância), tendo-se acrescentado solução salina 0,85%, até se obter, após agitação do frasco, DO = 0,5 em 5 mL de suspensão (KUSS et al., 2007), conforme Figura 4.17. Para a realização da leitura utilizou-se meio Dygs esterilizado como branco.

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 4.18).

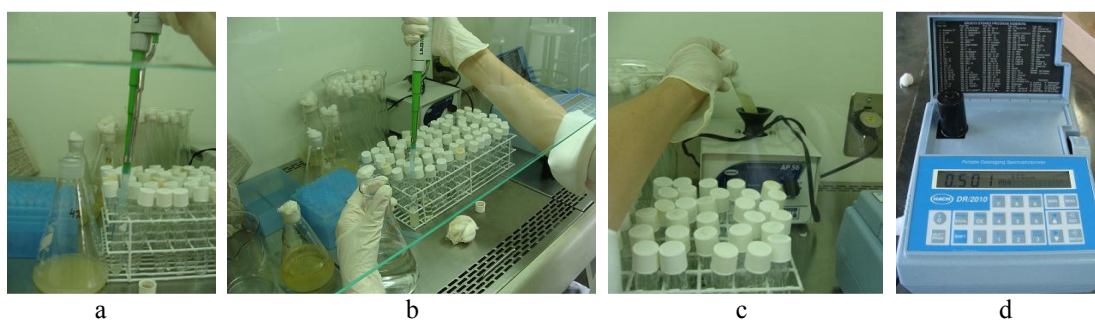


Figura 4.17. Determinação da densidade óptica: colocando suspensão bacteriana (a) e solução salina (b) em frasco; frasco sob agitação (c) e leitura da absorbância para obtenção de DO = 0,5 (d)

Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas homogêneas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante obtido, 3 mL foram vertidos em frascos, aos quais foram adicionados 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 utilizou-se como branco o meio Dygs esterilizado, com adição do reagente de Salkowski, sem inoculação. O meio de cultura 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 produção de ácido indolacético encontra-se representado na Figura 4.19, e a diferença de coloração dos frascos com e sem produção de AIA na Figura 4.20.

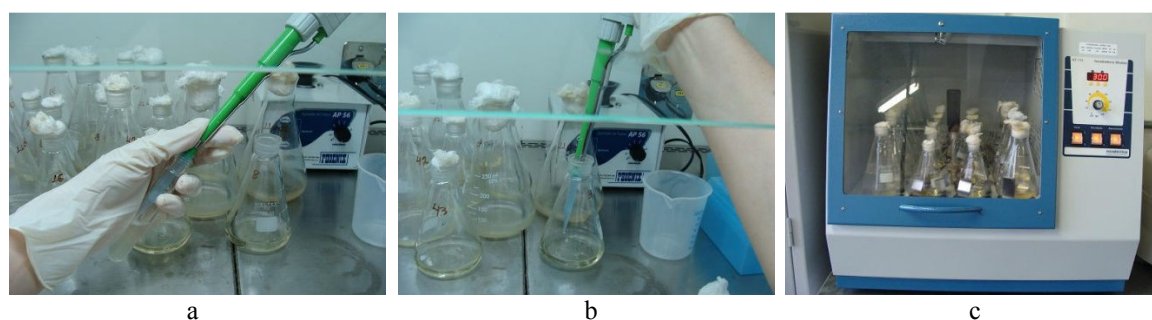


Figura 4.18. Crescimento com densidade óptica ajustada: retirando 0,5 mL de suspensão bacteriana (a) e colocando em erlenmeyer contendo meio Dygs líquido (b), e agitação a 30°C (c)

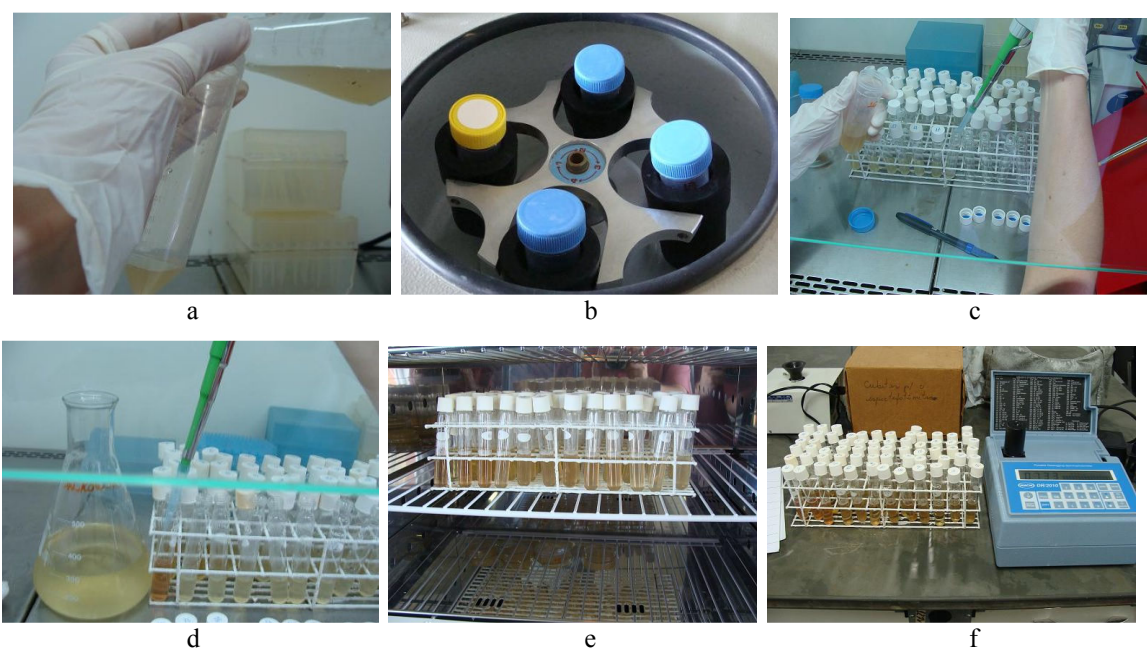


Figura 4.19. Método colorimétrico: colocando 15 mL de suspensão bacteriana em tubo (a), centrifugando os tubos (b), retirando 3 mL do sobrenadante e colocando em frasco (c), adicionando 2 mL do reagente de Salkowski (d), armazenamento em ambiente escuro (e) e leitura da absorbância dos frascos com coloração em tons de rosa avermelhado (f)

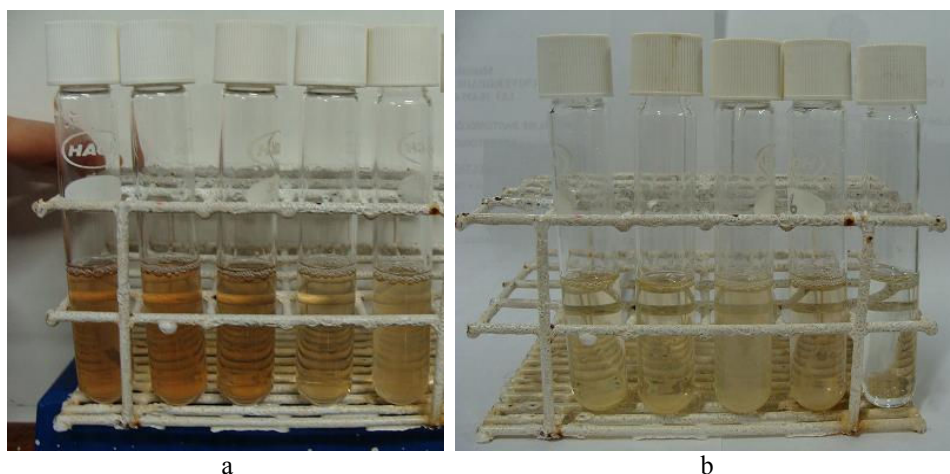


Figura 4.20. Coloração de isolados com e sem produção de AIA: alguns isolados de bactérias que apresentaram produção de AIA (a) e sem produção (b)

Assim como em Galdiano Júnior (2009), a concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura Dygs esterilizado não inoculado; quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de uma solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido 3-indolacético comercial padrão (Sigma-Aldrich®), e 2 mL do reagente de Salkowski em cada frasco (Figura 4.21). As concentrações utilizadas de AIA foram 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A equação obtida da curva padrão foi $y=0,0024x + 0,0144$ ($R^2 = 0,9952$). Os dados expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram submetidos à análise de variância (incluindo normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias) e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009) e seu complementar Tinn R.

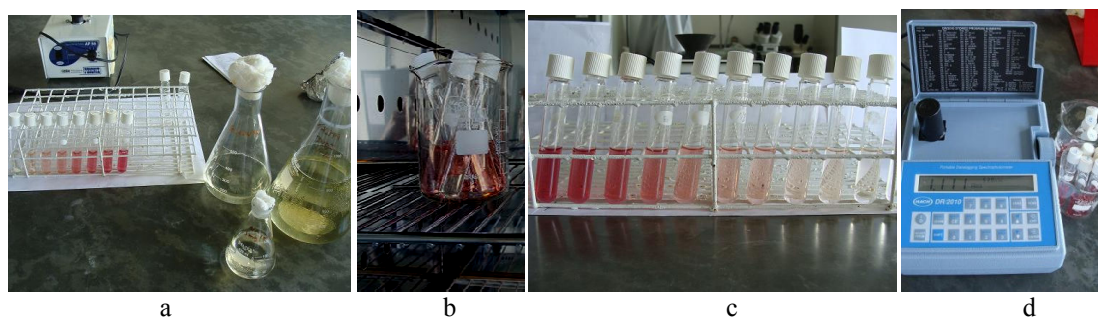


Figura 4.21. Determinação da curva padrão de AIA: frascos contendo meio Dygs líquido, reagente de Salkowski e diferentes concentrações de AIA (a), armazenamento em ambiente escuro (b), coloração de acordo com a concentração de AIA colocada (c) e leitura da absorbância em espectrofotômetro (d)

4.9. Experimento de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de BDNS

Buscou-se avaliar a possibilidade de utilização de isolados obtidos em Silva e Melloni (2011) como fontes de inóculo no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira. Para isso, instalou-se um experimento em casa de vegetação (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).

O experimento foi montado com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 11x3x5, sendo 11 fontes produtoras de hormônio (5 grupos de bactérias + 4 estirpes-tipo + 1 controle + 1 hormônio), 3 cultivares de oliveira (Grappolo 541, Arbequina e Ascolano 315) e 5 repetições. 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), utilizou-se este como uma forma de comparação ao tratamento de inoculação com as bactérias selecionadas. O controle foi realizado para comparação do enraizamento sem inoculação de bactérias e sem aplicação do hormônio AIB.

Para o experimento, realizaram-se as etapas detalhadas a seguir, no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Itajubá-UNIFEL.

a. Preparo do substrato (perlita)

A perlita é um substrato normalmente empregado para o enraizamento de estacas de oliveira (DEL RÍO; CABALLERO, 2005; OLIVEIRA et al., 2010a; OLIVEIRA et al., 2010b). A FEMF-EPAMIG cedeu o material para a instalação do experimento. O material foi peneirado em malha de 2 mm, para retirar impurezas finas, e colocado em balde com água corrente. O material sobrenadante foi esfregado e passado em peneira de 2 mm sobre água corrente por três vezes consecutivas. A perlita lavada foi esterilizada em autoclave e depois em estufa (170°C em 1 hora). O processo de lavagem da perlita encontra-se na Figura 4.22, e a esterilização a vapor e a seco, e a posterior disposição desse material, na Figura 4.23.



Figura 4.22. Lavagem da perlita: saco com perlita (a), peneirando materiais finos (b), perlita sendo molhada (c), esfregando o sobrenadante (d) e lavando este em água corrente (e), e perlita lavada sendo separada (f)

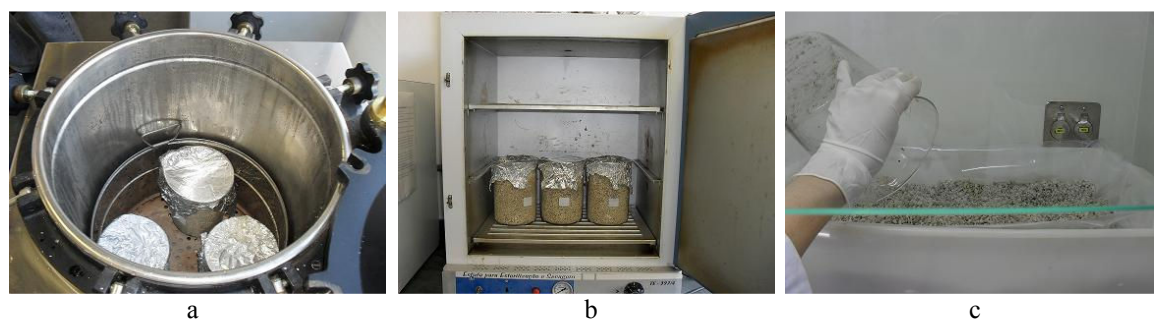


Figura 4.23. Esterilização e disposição da perlita: esterilização em autoclave (a) e em estufa (b), e disposição da perlita esterilizada (c)

Copos de plástico de 200 mL foram submetidos à luz ultravioleta por 30 minutos antes de receber a perlita esterilizada, a qual ocupou $\frac{3}{4}$ do volume dos mesmos (Figura 4.24).



Figura 4.24. Distribuição da perlita nos copos: copos em luz ultravioleta (a) e distribuição da perlita nos copos plásticos (c)

b. Fertilizante

O fertilizante empregado na FEMF-EPAMIG contém 80,0 de N, 60,0 de P, 150,0 de K, 2,0 de Zn, 0,5 de Cu, 2,0 de Fe, 5,0 de Mn, 4,0 de B e 0,5 de Mo, conforme embalagem do produto. 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, diluído a 25 mL L⁻¹, pelo volume de perlita foi feito conforme Oliveira et al. (2010a), sendo colocados em cada copo 9,4 mL. O fertilizante foi colocado em dosagem única (Figura 4.25), em todos os copos dos tratamentos estudados, anteriormente ao estaqueamento.

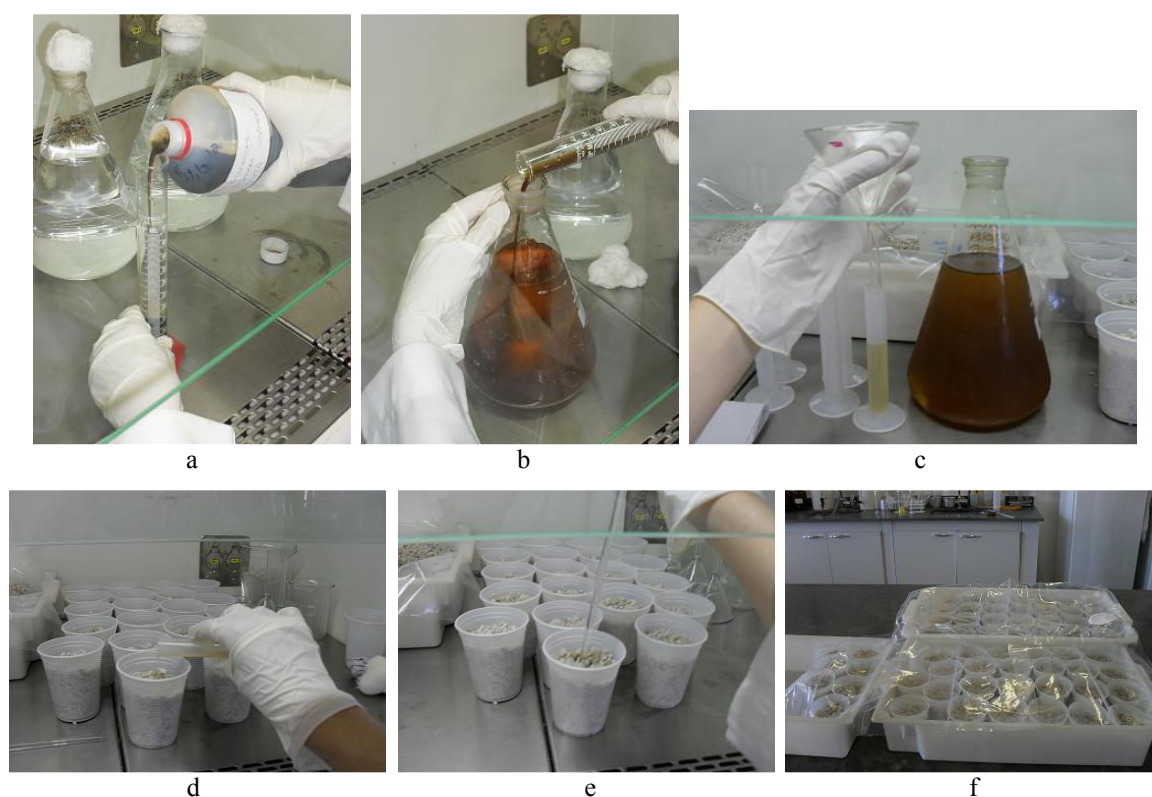


Figura 4.25. Fertilizante orgânico: diluindo fertilizante em água esterilizada (a-b), medindo fertilizante diluído (c) e colocando em cada copo (d), revolvendo perlita após adição do fertilizante (e), e disposição dos copos com fertilizante (f)

c. Obtenção das estacas

Os cultivares de oliveira do banco de germoplasma da FEMF-EPAMIG utilizados foram Grappolo 541, Arbequina e Ascolano 315 (Figura 4.26), uma vez que estes cultivares são de interesse comercial e vem sendo cultivados e estudados na Fazenda. As características dos cultivares estudados encontram-se na Tabela 4.3.

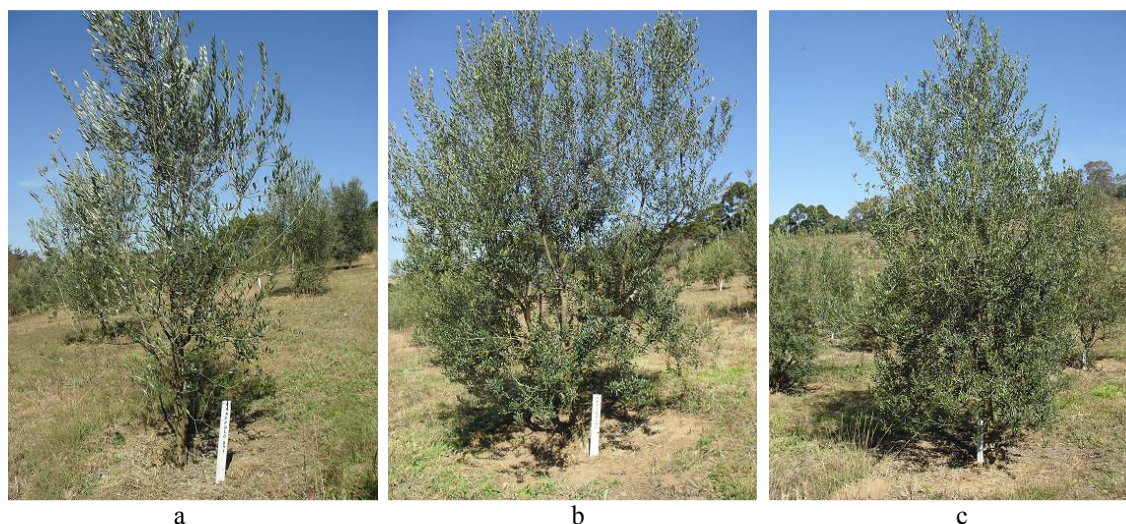


Figura 4.26. Cultivares de oliveira estudados: Grappolo 541 (a), Arbequina (b) e Ascolano 315 (c)

Tabela 4.3. Características dos cultivares de oliveira estudados

Cultivar	Origem	Porte	Vigor	Finalidade	Tamanho do Fruto (Peso)
Grappolo 541	Italiana	Aberto	Médio	Mesa e azeite	Médio
Arbequina	Espanhola	Ereto	Baixo	Azeite	Baixo
Ascolano 315	Italiana	Aberto	Alto	Mesa	Alto

Adaptado de Vieira Neto et al. (2008)

As estacas foram obtidas de ramos saudáveis e com folhas bem desenvolvidas, devidamente cortadas com 12 cm de comprimento, quatro entrenós e quatro folhas na região apical, conforme Oliveira et al. (2010a). Realizou-se um corte reto no ápice e outro em bisel na base da estaca. As estacas preparadas foram colocadas em sacos plásticos contendo água a fim de não secarem no transporte da Fazenda até o Laboratório de Microbiologia da UNIFEI. As estacas foram obtidas em 23 de junho de 2010. O processo de obtenção e armazenamento das estacas encontra-se na Figura 4.27. Ao todo foram necessárias 55 estacas para cada cultivar. Vale ressaltar que as estacas, ao serem transportadas ao laboratório, foram trabalhadas no mesmo dia a fim de se evitar ressecamento das mesmas, o que comprometeria os resultados do trabalho.



Figura 4.27. Obtenção e armazenamento das estacas de oliveira: poda de galhos no cultivar (a), corte dos galhos e preparo das estacas (b), e armazenamento das estacas dos cultivares estudados em sacos plásticos contendo água (c)

d. Desinfestação das estacas

O caule de todas as estacas foi desinfestado utilizando álcool 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994), e cinco lavagens sucessivas de toda a estaca em água destilada, conforme Figura 4.28.



Figura 4.28. Desinfestação das estacas: desinfestação das estacas com álcool (a), hipoclorito de sódio (b) e lavagens sucessivas com água destilada (c), e vista das estacas dos cultivares Ascolano 315, Arbequina e Grappolo 541 (da esquerda para a direita, respectivamente), após desinfestação (d)

e. 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 das bactérias dos cinco grupos montados (item 4.6) e das quatro estirpes-tipo (item 4.5), após agitação, foram colocadas cada uma em três tubos de ensaio (12 cm de altura e 2 cm de diâmetro). Após a seleção das 5 estacas com melhores condições em cada cultivar, estas tiveram seus caules imersos nos respectivos tubos de ensaio. Dessa forma, cada grupo de bactéria e estirpe-tipo estudados tiveram 3 tubos de ensaio e em cada tubo foram colocadas 5 estacas de cada cultivar, conforme as Figuras 4.29 e 4.30, respectivamente para os grupos de bactérias e estirpes-tipo. Os caules das estacas ficaram imersos nas suspensões bacterianas por 60 minutos,

sendo este o dobro do tempo deixado em Baldotto et al. (2010), para assegurar o maior tempo de contato da suspensão bacteriana com o caule da estaca.

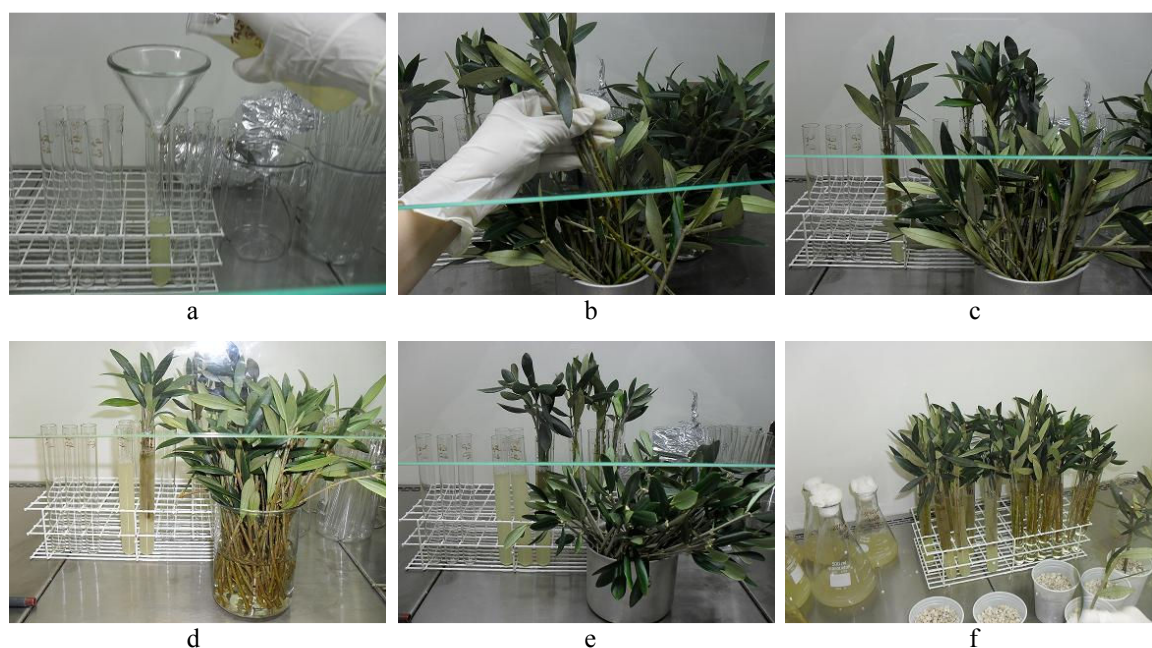


Figura 4.29. Inoculação dos grupos de bactérias nas estacas: colocando suspensão de bactéria de um determinado grupo em tubo de ensaio (a), selecionando estacas para a imersão (b), estacas com caules imersos dos cultivares Grappolo 541 (c), Arbequina (d) e Ascolano 315 (e) em um determinado grupo de bactérias, e vista geral das estacas com caules imersos em suspensões dos grupos de bactérias (f)

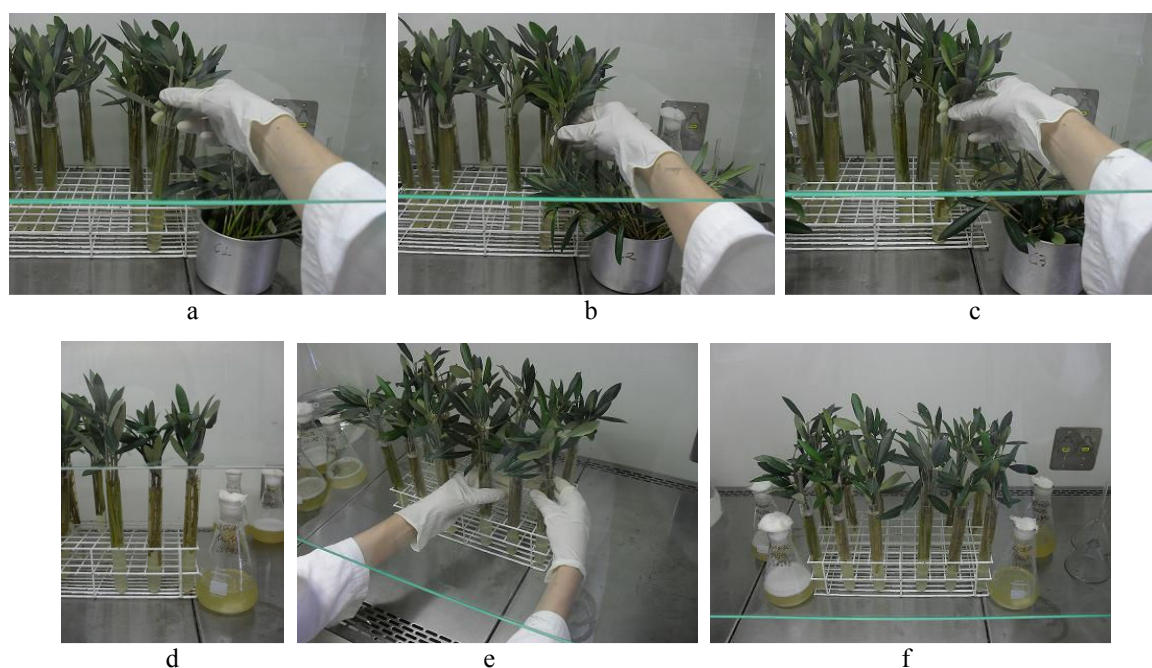


Figura 4.30. Inoculação das estirpes-tipo nas estacas: estacas com caules imersos dos cultivares Grappolo 541 (a), Arbequina (b) e Ascolano 315 (c) em uma determinada estirpe-tipo, estirpe-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001) com os cultivares estudados imersos (d), e vista geral das estacas com caules imersos em suspensões das estirpes-tipo (e-f)

No tratamento controle (Figura 4.31), o meio líquido Dygs autoclavado foi colocado em tubos de ensaio, as 5 estacas selecionadas de cada cultivar foram distribuídas nesses, e os caules ficaram imersos também por 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 4.31), com concentração de 3 g L^{-1} em solução 50% de água destilada e 50% de álcool, por cinco segundos, conforme as recomendações de Oliveira et al. (2010a).

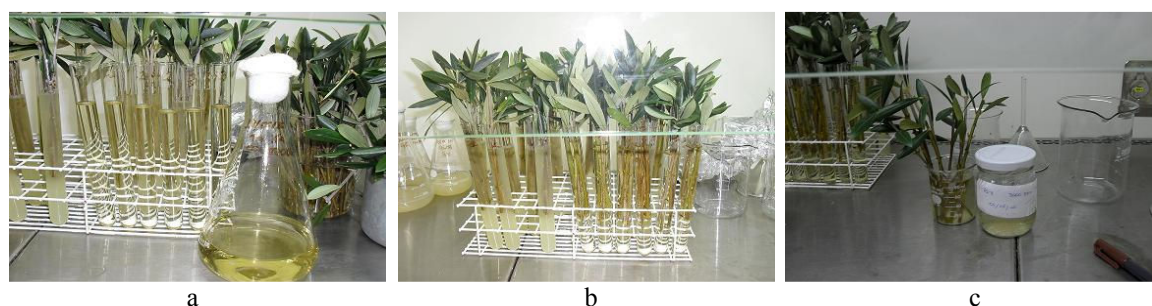


Figura 4.31. Imersão no hormônio AIB e tratamento controle: tubos preenchidos com meio líquido Dygs autoclavado (a), estacas dos cultivares estudados com caules imersos neste meio (b) e imersão da base das estacas em solução do hormônio AIB (b)

f. Plantio das estacas

As estacas foram plantadas individualmente nos copos contendo perlita com fertilizante, a 2/3 de seu comprimento (Figura 4.32). Antes do plantio, em todos os copos foram feitos 4 pequenos furos no fundo, a fim de evitar o encharcamento do material devido à nebulização na casa de vegetação da FEMF-EPAMIG.

Nos tratamentos dos grupos de bactérias e estirpes-tipo, o substrato em cada copo das repetições foi infestado com meio bacteriano restante no tubo de ensaio, após imersão das estacas, conforme Mello et al. (2002).

Imediatamente após o plantio, as estacas foram irrigadas com água destilada, as folhas nebulizadas também com água destilada, e colocadas em recipientes previamente umedecidos (bandejas de alumínio e isopor), conforme Figura 4.33, antes de serem transportadas até a FEMF.

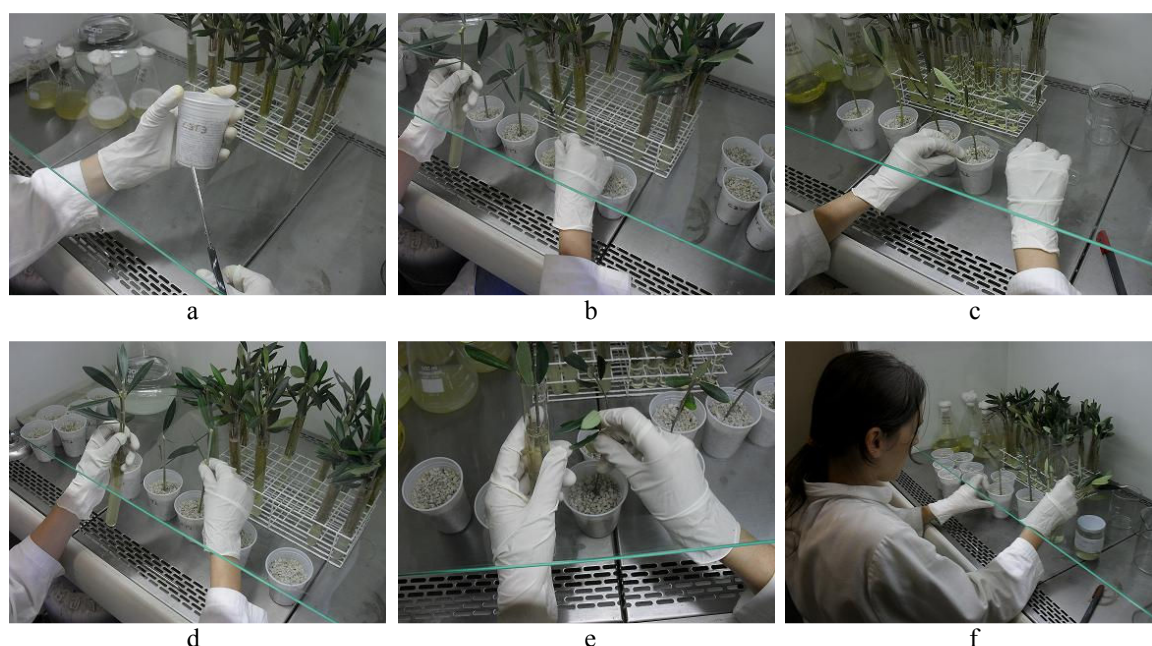


Figura 4.32. Plantio das estacas: fazendo furo no fundo do copo (a), plantio de estacas que foram imersas em um determinado grupo de bactérias (b), infestação do substrato com meio bacteriano, realizada nos grupos de bactérias e estirpes-tipo (c), plantio de estacas que foram imersas em uma determinada estirpe-tipo (d), e plantio de estacas nos tratamentos controle (e) e hormônio (f)

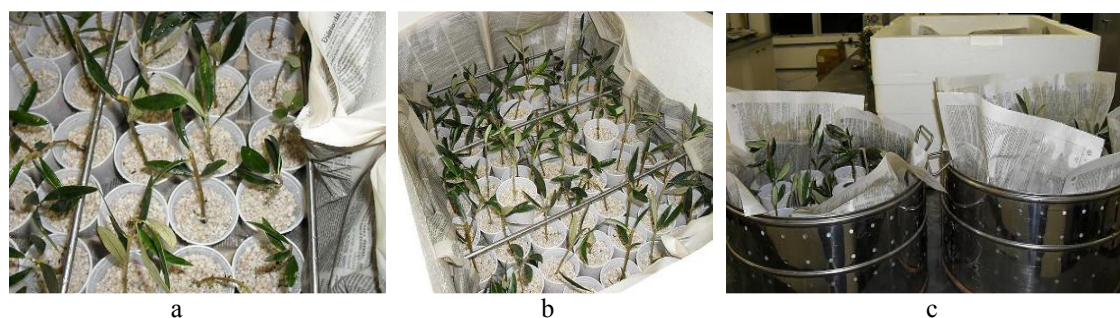


Figura 4.33. Armazenamento das estacas plantadas: vista das folhas molhadas (a), estacas em caixa de isopor (b) e bandejas de alumínio umedecidas (c)

g. Casa de vegetação

A casa de vegetação da FEMF apresenta temperatura controlada em $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Possui um sistema de nebulização intermitente (automatizada por um temporizador regulado para acionar às 7h e desligar às 19h, com nebulização acionada a cada 10 minutos por um período de 10 segundos) com irrigação por microaspersores distribuídos regularmente na parte superior da casa de vegetação. Dessa forma, consegue-se atingir um alto grau de umidade (80-90%) o qual é imprescindível para evitar que haja o caimento de folhas (DEL RÍO; CABALLERO, 2005).

As estacas com grupos de bactérias, estirpes-tipo, controle e hormônio foram preparados no dia 23/06/2010 e transportados no período da manhã do dia 24/06/2010 para

a casa de vegetação da FEMF-EPAMIG. No interior da casa de vegetação, os copos contendo perlita foram colocados em bancadas contendo areia com fundo aquecido, servindo como suporte aos copos, e as estacas deixadas eretas. A casa de vegetação, sua identificação e o processo de nebulização em funcionamento encontram-se na Figura 4.34, enquanto que distribuição dos copos no interior da mesma nas Figuras 4.35 e 4.36.

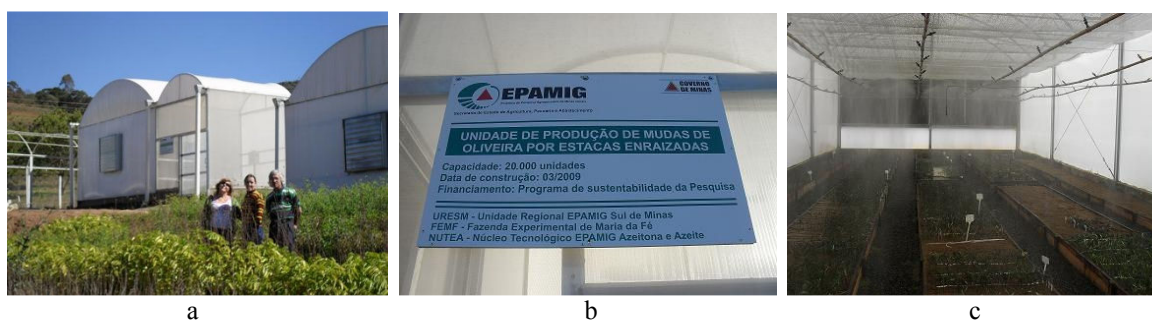


Figura 4.34. Casa de vegetação: vista da casa de vegetação, ao fundo, na FEMF (a), identificação na entrada da casa (b), e nebulização em funcionamento (c)



Figura 4.35. Copos com as estacas no interior da casa de vegetação: colocando os copos na bancada (a) e dividindo por tratamento (b)

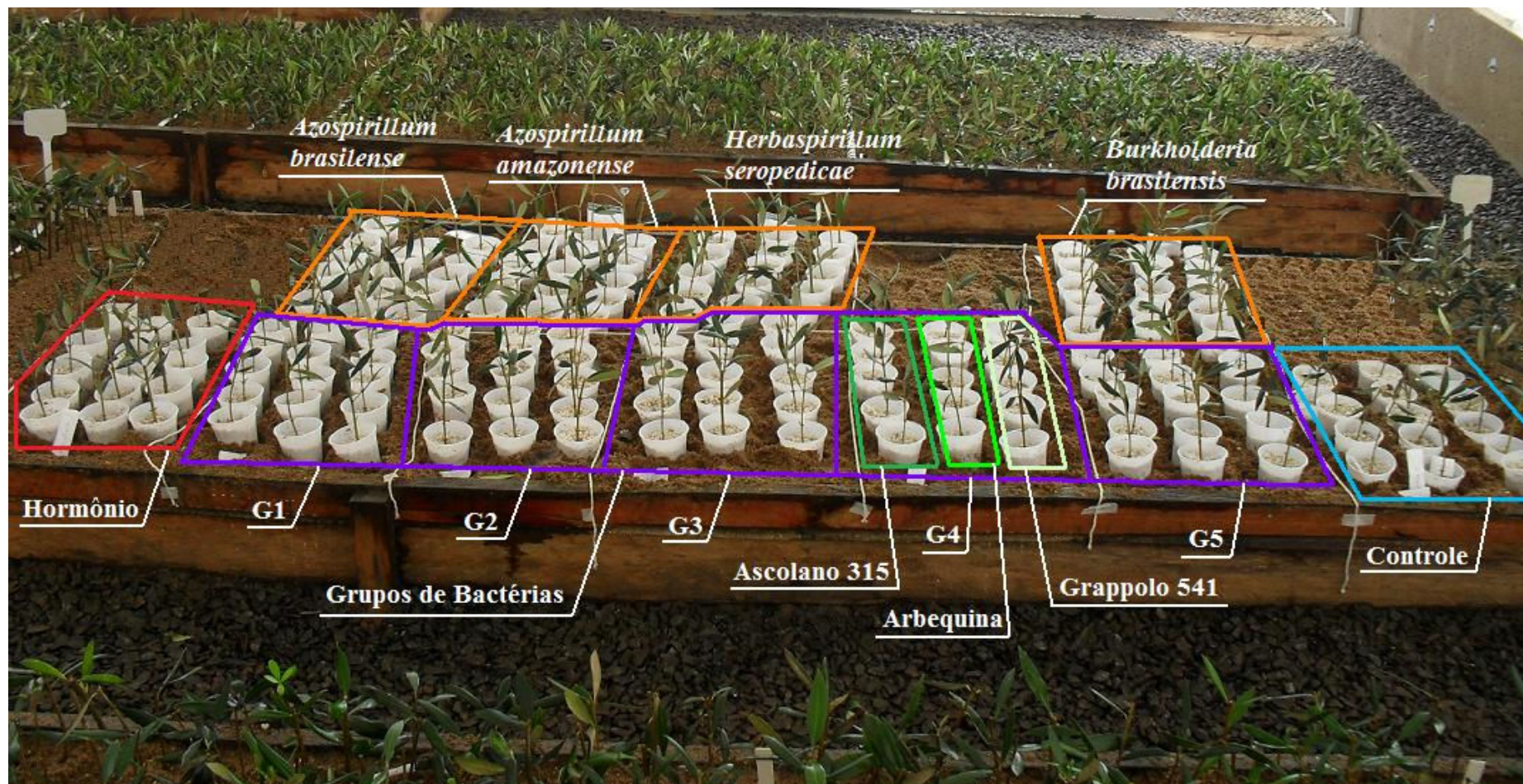


Figura 4.36. Distribuição dos tratamentos ao longo da bancada: da esquerda para direita, tratamento apenas com hormônio (à extrema esquerda), tratamento com grupos de bactérias G1, G2, G3, G4 e G5 (parte inferior), tratamento com estirpes-tipo *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasitensis* (parte superior), e tratamento controle (extrema direita). A ordem das fileiras dos cultivares em todos os tratamentos, seguindo da esquerda para a direita, foi: Ascolano 315, Arbequina e Grappolo 541, respectivamente

h. Condução do experimento

Ao longo do período que as estacas ficaram na casa de vegetação foram realizadas visitas quinzenais para verificar as condições do experimento (Figura 4.37), ou seja, queda de folhas, manutenção da umidade foliar, formação de calo, enraizamento, brotações, umidade do substrato e controle de doenças e pragas.

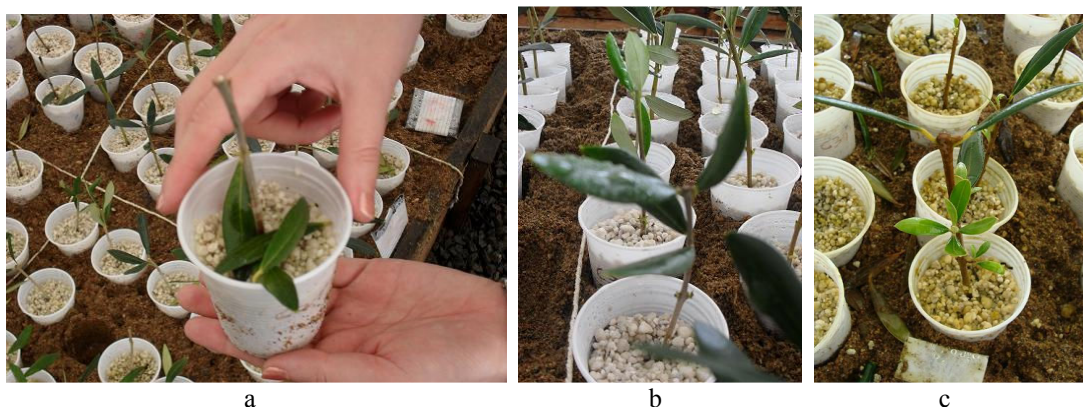


Figura 4.37. Queda de folhas: detalhe do cultivar Arbutus unedo com total queda de folhas (a), umidade foliar devido à nebulização (b) e crescimento de brotações em algumas estacas (c)

i. Avaliação do potencial de enraizamento

Após seis meses foi feita a retirada das estacas da perlita, sendo verificados em todos os tratamentos os seguintes atributos: 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; porcentagem de estacas com folhas verdes; número médio de folhas verdes; porcentagem de estacas com brotação; número médio de brotações e comprimento médio de brotações, conforme trabalhos de Pio et al. (2005), Oliveira et al. (2010a), Oliveira et al. (2010b), Vieira Neto et al. (2010). A avaliação do potencial de enraizamento foi feita visualmente e por meio de paquímetro, como mostrado na Figura 4.38.



Figura 4.38. Avaliação do potencial de enraizamento: análise visual e quantitativa dos atributos da estaca (a), medindo comprimento de brotação (b) e de raiz (c), estacas com calo e estacas mortas com brotação (d), estaca com calo e sem folhas verdes e estacas mortas com e sem folhas verdes (e), enraizamento em determinadas estacas inoculadas com bactérias do grupo G1 (f) e do grupo G4 (g), e enraizamento em estacas inoculadas com a estirpe-tipo *Azospirillum amazonense* (h)

j. Análise estatística

As médias dos atributos avaliados foram submetidas à análise de componentes principais (ACP), utilizando-se o programa PC-ORD 3.12 (McCUNE; MEFFORD, 1997). Essa técnica é freqüentemente utilizada para reduzir o número de variáveis totais para discussão, distribuídas de acordo com componentes principais (CP) de maior correlação dos dados (BARETTA et al., 2008), tornando a análise mais eficiente e mantendo a maioria ou todas as informações originais (REYMENT; JÖRESKOG, 1993).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes de diversidade fisiológica dos isolados e estirpes-tipo de BDNS

a. Solubilização de fosfato

Somente os isolados bacterianos de números 32 e 47, pertencentes aos grupos G3 e G5, respectivamente, apresentaram formação do halo transparente em torno da colônia, caracterizando solubilização de fosfato, a qual pode influenciar o mecanismo de promoção de crescimento das bactérias às plantas (BISWAS et al., 2000). No entanto, em Baldotto et al. (2010), dos 20 isolados bacterianos estudados, 11 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato e das 4 estirpes-tipo analisadas por Mehnaz et al. (2010), duas apresentaram solubilização. Essa capacidade de solubilização de fosfato se deve às variações genéticas dos isolados em sintetizarem ácidos orgânicos, como o ácido glucônico, sendo este o principal mecanismo de ação na solubilização (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Segundo Pedrinho (2009), para que a quantidade de fósforo liberado por bactérias solubilizadoras seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a inoculação desses microrganismos em concentrações elevadas. No atual estudo, em virtude da diversidade de isolados de bactérias em um mesmo grupo, mesmo em alta quantidade inoculada por parcela (10^8 células mL⁻¹), a densidade específica daquelas solubilizadoras pode não ter sido suficiente para promover o crescimento das plantas.

b. Crescimento em diferentes condições de pH e temperatura

As notas referentes ao percentual de crescimento médio de cada isolado bacteriano e estirpe-tipo analisada, encontram-se nas Tabelas 5.1 e 5.2 para cada valor de pH e temperatura, respectivamente.

Nota-se que houve variação no comportamento do crescimento entre os isolados dentro de um mesmo grupo, mostrando assim a diversidade fisiológica de cada um destes perante as condições analisadas. Tendo em vista que a temperatura média da casa de vegetação é de 25°C, os resultados mostraram que os isolados possuem capacidade de crescimento nesse ambiente.

Tabela 5.1. Valores de crescimento dos isolados dentro dos grupos e estirpes-tipo de BDNS, em diferentes condições de pH

Grupos	Isolado/ estirpe-tipo	pH*						
		4	5	6	6,4	7	8	9
G1	8	1	5	5	5	5	5	5
	13	1	5	5	5	5	5	5
	14	0	4	5	5	3	2	2
	16	0	5	5	5	3	2	2
G2	17	5	5	5	5	5	5	4
	26	5	5	5	5	2	2	2
	38	1	5	5	5	5	5	5
	39	5	5	5	5	5	5	4
G3	30	2	5	5	5	5	2	2
	31	2	5	5	5	5	4	4
	32	2	5	5	5	5	5	4
G4	33	1	5	5	5	5	5	5
	42	5	5	5	5	5	5	5
	43	4	5	5	5	5	4	4
G5	47	5	5	5	5	4	4	4
	48	3	5	5	5	5	5	4
	50	3	5	5	5	5	5	5
Estirpes- tipo	<i>A. brasilense</i>	3	5	5	5	4	4	3
	<i>A. amazonense</i>	1	5	5	5	2	2	2
	<i>H. seropedicae</i>	1	5	5	5	5	5	5
	<i>B. brasiliensis</i>	5	5	5	5	5	5	5

* Valores referentes às médias dos percentuais de crescimento: 0 (ausência de crescimento), 1 (1-19%), 2 (20-39%), 3 (40-59%), 4 (60-79%) e 5 (80-100%)

Na tabela 5.3 são apresentadas as faixas das condições ótimas de pH e temperatura para máximo crescimento dos grupos de isolados e das estirpes-tipo. Pode-se observar que, em virtude das amplas faixas de pH e temperatura, os grupos apresentaram exigências ambientais muito similares quanto ao máximo crescimento. Isso mostra que uma bactéria isolada de uma condição específica de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos pode não possuir limitação de crescimento em outras condições de pH e temperatura, como observado por Florentino et al. (2010). Essa característica garante melhor adaptação às diferentes condições edafoclimáticas a que a oliveira pode ser submetida, além de facilitar o cultivo e produção de inóculo em laboratório.

Tabela 5.2. Valores de crescimento dos isolados dentro dos grupos e estirpes-tipo de BDNS, em diferentes condições de temperatura

Grupos	Isolado/ estirpe-tipo	Temperatura (°C)*						
		10	15	20	28	35	40	45
G1	8	4	4	5	5	5	4	3
	13	3	5	5	5	5	5	4
	14	2	3	3	5	5	5	0
	16	5	5	5	5	5	4	2
G2	17	4	4	4	5	5	5	5
	26	4	3	4	5	5	5	5
	38	5	5	5	5	5	5	4
	39	3	5	5	5	5	2	2
G3	30	3	5	5	5	5	5	5
	31	3	4	5	5	5	5	2
	32	4	5	5	5	4	4	4
G4	33	4	5	5	5	5	5	5
	42	1	4	5	5	5	5	4
	43	4	5	5	5	5	4	4
G5	47	3	5	5	5	5	3	2
	48	3	5	5	5	5	5	5
	50	3	5	5	5	5	5	4
Estirpes- tipo	<i>A. brasilense</i>	3	5	5	5	5	4	3
	<i>A. amazonense</i>	2	2	3	5	5	1	0
	<i>H. seropedicae</i>	4	5	5	5	5	4	4
	<i>B. brasiliensis</i>	4	5	5	5	5	4	4

* Valores referentes às médias dos percentuais de crescimento: 0 (ausência de crescimento), 1 (1-19%), 2 (20-39%), 3 (40-59%), 4 (60-79%) e 5 (80-100%)

Tabela 5.3. Faixa de crescimento ideal de pH e temperatura dos agrupamentos analisados de BDNS

Agrupamento	Condição ótima	
	pH	Temperatura (°C)
G1	5 – 6,4	15 – 40
G2	5 – 8	15 – 35
G3	5 – 7	15 – 40
G4	5 – 9	15 – 45
G5	5 – 9	15 – 35
Estirpes-tipo	5 – 9	15 – 35

c. Resistência a antibióticos

Os diâmetros médios dos halos de inibição formados nos antibióticos testados para cada isolado e estirpe-tipo de BDNS encontram-se na Tabela 5.4. Como a média de todos os halos formados foi de 1,67 cm, foram considerados sensíveis os isolados e estirpes-tipo que apresentaram diâmetros médios iguais ou superiores a 1,67 cm.

Nota-se que o comportamento dos grupos de bactérias e das estirpes-tipo foram muito semelhantes com relação aos antibióticos cloranfenicol (CLO), estreptomicina (EST) e kanamicina (KAN), todos apresentando maior sensibilidade com relação a estes antibióticos (diâmetro $\geq 1,67$ cm). Os antibióticos amoxicilina e ampicilina praticamente não proporcionaram formação de halo nos grupos bacterianos. Nos antibióticos tetraciclina (TET), rifamicina (RFM) e eritromicina (ERI) a maioria dos halos formados não ultrapassaram o valor médio de 1,67 cm, indicando que os isolados e estirpes-tipo podem ser considerados resistentes a esses.

Analisando-se pela diversidade fisiológica, é interessante que haja variações de sensibilidade e resistência entre os isolados bacterianos e estirpes-tipo, e também entre os grupos, para um mesmo antibiótico. Nesse caso, os antibióticos com maior potencial de utilização em termos de diversidade, nas condições do presente estudo, são: azitromicina (AZI) e gentamicina (GEN).

Tabela 5.4. Diâmetro médio dos halos de inibição formados nos discos dos antibióticos testados em cada isolado bacteriano e estirpe-tipo

Grupos	Número do isolado / estirpes-tipo	Antibióticos – Diâmetro do halo (cm)									
		AMO	AMP	AZI	CLO	ERI	EST	GEN	KAN	RFM	TET
G1	8	-	-	1,52 ± 0,08	1,87 ± 0,11	-	1,71 ± 0,17	1,60 ± 0,08	1,95 ± 0,03	0,91 ± 0,01	1,43 ± 0,14
	13	-	-	2,17 ± 0,04	2,19 ± 0,09	1,19 ± 0,01	1,95 ± 0,09	1,61 ± 0,05	2,16 ± 0,10	0,85 ± 0,03	1,47 ± 0,04
	14	-	-	1,78 ± 0,13	2,13 ± 0,15	1,20 ± 0,15	1,77 ± 0,03	1,47 ± 0,04	2,05 ± 0,07	0,92 ± 0,04	1,21 ± 0,06
	16	-	-	1,69 ± 0,04	1,77 ± 0,05	-	1,88 ± 0,13	1,74 ± 0,11	2,18 ± 0,18	0,92 ± 0,10	1,38 ± 0,03
G2	17	-	-	1,90 ± 0,09	2,08 ± 0,03	0,73 ± 0,04	1,75 ± 0,09	1,44 ± 0,03	1,92 ± 0,07	0,92 ± 0,06	1,37 ± 0,08
	26	-	-	1,91 ± 0,15	2,04 ± 0,06	0,92 ± 0,00	1,78 ± 0,13	1,47 ± 0,06	1,92 ± 0,10	1,03 ± 0,15	1,17 ± 0,19
	38	1,39 ± 0,05	1,31 ± 0,01	1,42 ± 0,17	1,72 ± 0,03	-	1,71 ± 0,01	1,71 ± 0,02	2,04 ± 0,07	0,79 ± 0,01	1,58 ± 0,03
	39	-	-	1,66 ± 0,12	2,06 ± 0,12	-	1,88 ± 0,12	1,69 ± 0,06	1,95 ± 0,11	1,10 ± 0,03	1,44 ± 0,13
G3	30	-	-	1,84 ± 0,07	1,72 ± 0,14	0,78 ± 0,01	1,87 ± 0,05	1,53 ± 0,02	1,00 ± 0,07	0,94 ± 0,04	1,27 ± 0,03
	31	-	-	2,03 ± 0,13	1,81 ± 0,03	-	1,95 ± 0,04	1,70 ± 0,06	2,17 ± 0,06	1,01 ± 0,09	1,49 ± 0,05
	32	-	-	1,48 ± 0,17	1,57 ± 0,15	0,79 ± 0,01	1,15 ± 0,10	1,49 ± 0,01	1,95 ± 0,03	0,87 ± 0,05	1,21 ± 0,06
G4	33	-	-	3,09 ± 0,01	2,01 ± 0,09	3,03 ± 0,16	2,07 ± 0,07	1,71 ± 0,01	2,05 ± 0,05	1,18 ± 0,03	1,67 ± 0,08
	42	-	-	1,96 ± 0,05	2,28 ± 0,08	-	1,86 ± 0,09	1,67 ± 0,11	2,18 ± 0,08	0,92 ± 0,10	1,27 ± 0,06
	43	-	-	1,39 ± 0,01	1,77 ± 0,13	-	1,86 ± 0,13	1,90 ± 0,02	2,13 ± 0,08	0,97 ± 0,10	1,51 ± 0,04
G5	47	-	-	1,52 ± 0,13	2,01 ± 0,16	1,05 ± 0,00	1,83 ± 0,10	1,63 ± 0,13	2,10 ± 0,13	0,95 ± 0,04	1,22 ± 0,07
	48	2,88 ± 0,03	2,93 ± 0,19	1,78 ± 0,13	2,08 ± 0,09	3,19 ± 0,08	2,05 ± 0,06	1,72 ± 0,12	2,26 ± 0,05	0,98 ± 0,08	1,47 ± 0,16
	50	-	-	2,93 ± 0,10	1,99 ± 0,10	2,68 ± 0,08	1,63 ± 0,03	1,56 ± 0,13	1,87 ± 0,05	1,12 ± 0,17	1,79 ± 0,04
Estirpes-tipo	<i>A. brasilense</i>	-	-	1,42 ± 0,15	1,85 ± 0,12	-	1,76 ± 0,05	1,35 ± 0,19	2,06 ± 0,08	0,93 ± 0,01	1,71 ± 0,04
	<i>A. amazonense</i>	-	-	1,29 ± 0,04	1,96 ± 0,06	-	1,78 ± 0,11	1,64 ± 0,09	1,95 ± 0,19	0,99 ± 0,10	1,61 ± 0,09
	<i>H. seropedicae</i>	-	-	1,58 ± 0,15	2,03 ± 0,08	-	1,77 ± 0,04	1,74 ± 0,03	2,12 ± 0,03	0,97 ± 0,11	1,71 ± 0,05
	<i>B. brasiliensis</i>	-	-	1,55 ± 0,05	2,17 ± 0,13	-	1,83 ± 0,02	1,87 ± 0,04	2,14 ± 0,07	1,03 ± 0,04	1,78 ± 0,12

- ausência de formação do halo; AMO = amoxicilina, AMP = ampicilina, AZI = azitromicina, CLO = cloranfenicol, ERI = eritromicina, EST = estreptomicina, GEN = gentamicina, KAN = kanamicina, RFM = rifamicina e TET = tetraciclina. Valores em negrito indicam que o diâmetro médio de halo de inibição é igual ou maior que o valor médio total apresentado em diferentes antibióticos (1,67 cm), caracterizando sensibilidade do isolado ao antibiótico.

d. Produção de ácido indolacético pelo método colorimétrico

A produção de ácido indolacético (AIA) para os isolados e estirpes-tipo de BDNS encontram-se na Figura 5.1. Os isolados 13, 26, 30, 33 e 50, sendo cada um dos grupos G1 ao G5, respectivamente, não apresentaram produção de AIA pelo teste colorimétrico. Os resultados mostraram variação na produção do AIA nos isolados bacterianos dentro dos grupos e entre estes.

Os valores de produção de AIA obtidos nas estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* foram superiores às mesmas estirpes-tipo testadas em Kuss et al. (2007) com produção de 5,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. brasilense*, e Galdiano Júnior (2009) com produção de 42,5 e 105,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. brasilense* e *H. seropedicae*, respectivamente.

A linha traçada na Figura 5.1 representa o menor valor de AIA produzido no grupo das estirpes-tipo. A partir dessa linha nota-se que apenas o isolado 8 do grupo G1 apresentou produção de AIA abaixo do valor mínimo das estirpes, mostrando assim que os grupos dos isolados em geral tiveram valores estatisticamente iguais ou superiores aos obtidos pelas estirpes-tipo. Vale ressaltar que os grupos G3, G4 e G2 tiveram isolados com valores de produção de AIA estatisticamente bem maiores, respectivamente nessa ordem.

Os isolados e estirpes-tipo apresentaram uma produção de AIA variando de 110,53 a 383,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a maioria dos valores relativamente maiores à faixa encontrada nos isolados obtidos por Silva (2010) em raízes de *Brachiaria brizantha*, que foi de 0,39 a 195 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e bem superiores aos isolados de Kuss et al. (2007) em raízes de arroz, onde variaram de 2,79 a 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e de Galdiano Júnior (2009) em raízes de orquídeas, variando de 0,4 a 100,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em Pedrinho (2009), os isolados em raízes de milho apresentaram produção de AIA em meio Dygs, após 72h, variando de 1,23 a 110 $\mu\text{g mL}^{-1}$, novamente abaixo dos valores obtidos no presente estudo, mostrando 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).

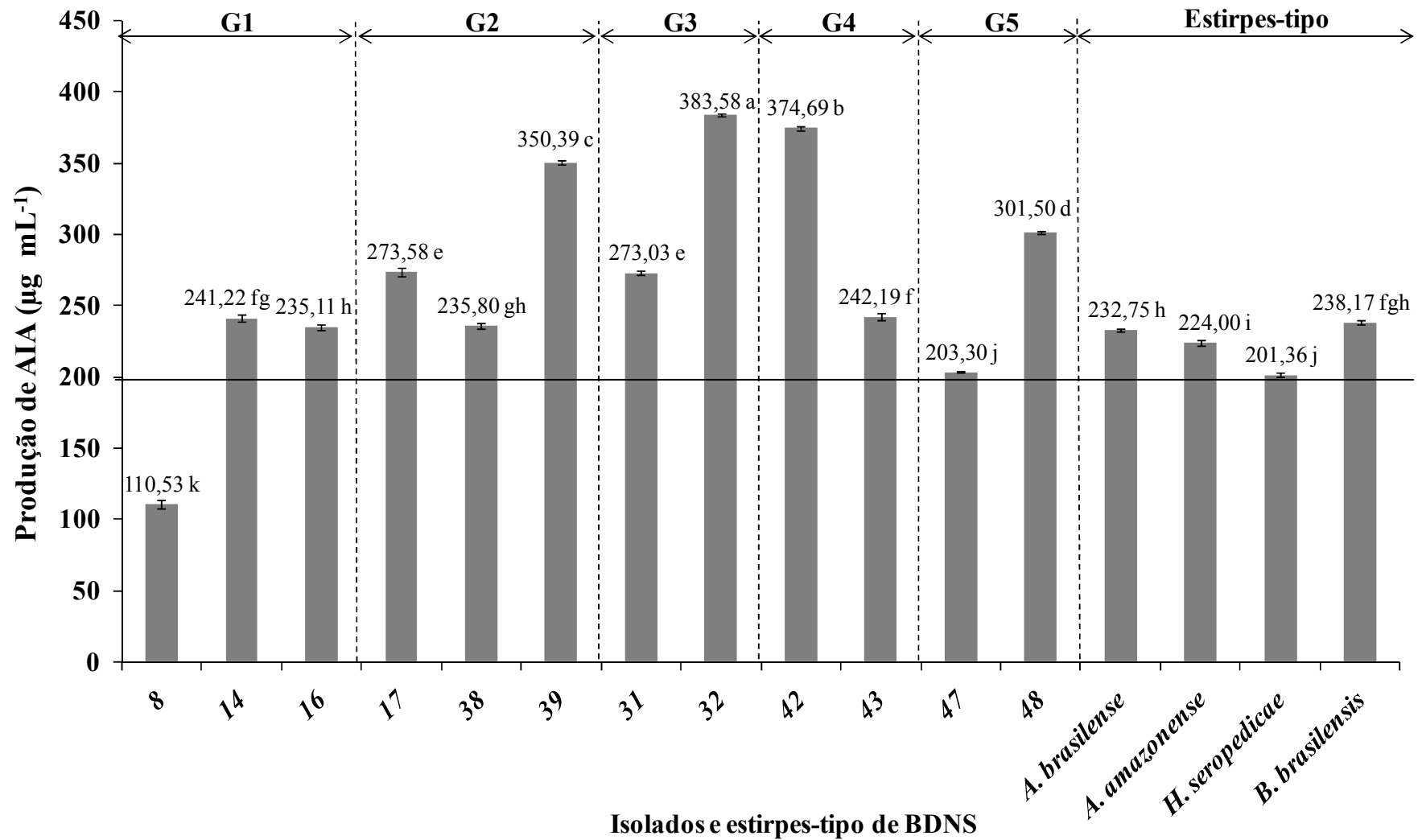


Figura 5.1. Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados e estirpes-tipo de BDNS. Isolados de números 13, 26, 30, 33 e 50 sem produção de AIA. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Linha contínua representa o menor valor de AIA no grupo das estirpes-tipo.

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

O resultado da análise de componentes principais (ACP), com base nas médias dos atributos avaliados para o potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de BDNS (Anexo 1), está representado na Figura 6.2. Os componentes principais apresentados compuseram 60,7% da variância total dos dados, sendo que o PC1 apresentou 42,3% da variância e o PC2 18,4% do total.

A análise pode ser dividida em duas fases: 1) estudo da distribuição dos atributos nos quadrantes e 2) estudo da distribuição dos tratamentos nos quadrantes.

Fase 1: Os atributos relacionados à formação do calo e posterior enraizamento e formação de parte aérea ocuparam o quadrante à esquerda, em oposição ao atributo morte da estaca, que ocupou o quadrante à direita. Podem ser considerados atributos antagônicos, estaca viva e estaca morta, após 6 meses de observação.

Fase 2: Os tratamentos, em sua grande maioria, ocuparam posições irregulares nos quadrantes, independentemente do cultivar e fonte de inóculo. No entanto, verifica-se que as estacas inoculadas com as estirpes-tipo (*Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*) estiveram agrupadas ao longo dos quadrantes à esquerda (círculos com linha contínua fina), em posição oposta ao atributo morte da estaca. Esse resultado indica que houve forte tendência das estacas inoculadas com estirpes-tipo a apresentarem maior potencial de sobrevivência e desenvolvimento. Cabe ressaltar também que, especificamente o cultivar Arbequina, quando inoculado com bactérias dos grupos G1 e G4 (círculos com linha tracejada), se agrupou aos cultivares inoculados com as estirpes-tipo, indicando que os isolados destes grupos, para o cultivar em questão, apresentam potencial de utilização no enraizamento. Analisando-se o comportamento do tratamento com hormônio (círculos com linha contínua grossa), nota-se que os tratamentos com as estirpes-tipo e com os grupos G1 e G4 para o cultivar Arbequina possuem potencial de enraizamento tanto quanto o hormônio. Para os demais cultivares, quando inoculados com os isolados de todos os grupos, não foram efetivamente capazes de promover sobrevida e desenvolvimento das estacas, nas condições experimentais.

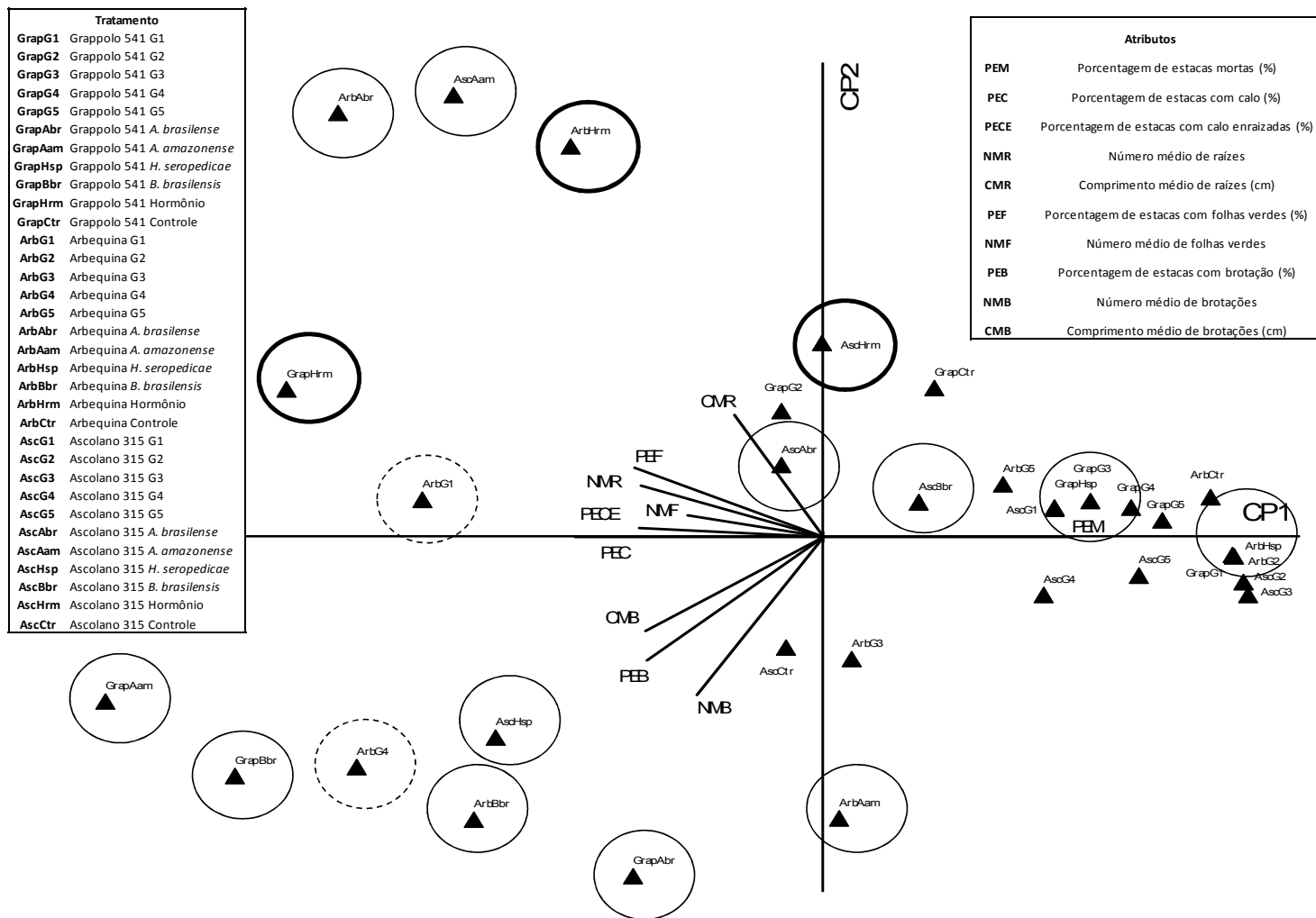


Figura 5.2. Resultado da análise de componentes principais para as médias dos atributos relacionados à sobrevivência e desenvolvimento das estacas diante dos diferentes tratamentos (▲). Círculo em linha cheia grossa ao redor do tratamento indica imersão das estacas no hormônio AIB, círculo em linha cheia fina ao redor do tratamento indica a inoculação com estirpes-tipo e linha tracejada os tratamentos semelhantes àqueles envolvendo as estirpes-tipo.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados de BDNS apresentaram alta diversidade fisiológica, avaliada quanto ao crescimento em diferentes condições de pH e temperatura, resistência a antibióticos e produção de AIA.
- ✓ A ampla faixa de condições de cultivo *in vitro* permite inferir que os isolados possuem potencial de aplicação na olivicultura, sob diferentes condições edafoclimáticas.
- ✓ Os isolados apresentaram alta sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol, estreptomicina e kanamicina, recomendando-se, em estudos de diversidade fisiológica, a utilização de azitromicina e gentamicina, com maior capacidade de discriminação.
- ✓ A alta produção de AIA pelos isolados, contrariamente à baixa capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, possibilitou enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira, de forma semelhante ao promovido por hormônio, apenas para as estirpes-tipo e para o cultivar Arbequina inoculado com os grupos G1 e G4.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser um estudo pioneiro relacionado à BDNS e oliveira, pode ser que a metodologia de inoculação utilizada não seja a mais eficiente. Como as estirpes-tipo e os isolados dos grupos G1 e G4 apresentaram potencial de enraizamento, recomenda-se a realização de estudos complementares como adaptações na metodologia de inoculação e maior número de repetições por tratamento, a fim de garantir maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

De toda forma, a utilização de BNDS como microrganismos promotores de crescimento com diferentes cultivares de oliveira contribui para a avaliação das estratégias adotadas na condução da cultura, auxiliando na busca por tecnologias capazes de acelerar a implantação e sustentabilidade dessa cultura no Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.
- BALDANI, J.I., AZEVEDO, M.S. de; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p.621-666.
- 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**, Baltimore, v.36, n.1, p 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.922-928, 1997a.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* ssp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 234p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1996.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997b.
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.349-360, 2010.
- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca**. 1994. 302f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1994.
- BARETTA, D.; BARETTA, C.R.D.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2683-2691, 2008.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: enviromental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, 2000. p.409-410.

- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacea*. **Microbiology**, New York, v.140, p.1069-1077, 1994.
- BIASI, L.A. Emprego do estiolamento na propagação de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p.309-315, 1996.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZ, F.B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Scientific Society American**, v.64, p. 1644-1650, 2000.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.535-538, 1991.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, v.144, p.1989-1999, 1998.
- BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St Paul, v.40, p.115-117, 1950.
- CABALLERO, J.M. **Multiplicación del olivo por estaquillado semileñoso bajo nebulización**. Madrid: INIA, 1981. 39p. (INIA. Comunicaciones Producción Vegetal, 31).
- CABALLERO, J.M.; DEL RÍO, C. Métodos de multiplicación. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Ed.). **El cultivo del olivo**. 5 ed. Madrid: Mundi-Prensa; Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la junta de Andalucía, 2004.
- 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.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂-fixing rhizospheric and endophy species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1165-1172, 2004.
- CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.M.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Avaliação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar originada de sementes e inoculada com endófitos fixadores de nitrogênio. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.62-64, 2003.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C.S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Washington, v.5, p.719-729, 2003.
- CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; CONCEIÇÃO, P.S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1880-1883, set., 2009.
- COUTINHO, B.C.; MIRANDA, G.B.; SAMPAIO, G.R.; DE SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, ano 20, dez. 2004.

- CPTEC - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - **Plataforma de coleta de dados**. Disponível em: <http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/historico/consulta_pcdm.jsp>. Acesso em 6 de maio de 2010.
- DEKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the Genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v.20, n.1, p.72-77, 1997.
- DEL RÍO, C.; CABALLERO, J.M. Aptitud al enraizamiento. In: RALLO, L.; BARRANCO, D.; CABALLERO, J.M.; DEL RÍO, C.; MARTÍN, A.; TOUS, J.; TRUJILLO, I., eds. **Varietades de olivo en Españã (Libro II: Variabilidad y selección)**. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 2005. p.276-281.
- DEL RÍO, C.; RALLO, L.; CABALLERO, J.M. Effects of carbohydrate contents on seasonal rooting of vegetative and reproductive cuttings of olive. **Journal of Horticultural Science**, v.66, n.3, p.301-309, 1991.
- DENARDIN, N.D. (2007). **Inoculante garante sucesso na fixação do nitrogênio**. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23524>>. Acesso em 25 agosto 2010, 10:40h.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; TRYIS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, F.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v.44, p.310-313, 1992a.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., eds. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992b. p.173-180.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa- CNPAB, 1995, 60p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., Washington, 1976. **Proceedings**. Washington: Washington State University, 1976. p.518-538.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Wisconsin, v.67, p.2790-2798, 2001.

- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa, 2005. 221p.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.
- FAGES, J.; MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**, v.8, p.309-315, 1988.
- FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISHER, M. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Technology**, v.12, p.511-515, 1996.
- FERREIRA, J.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.32, n.1, p.179-185, 2010.
- FLORENTINO, L.A.; SOUSA, P.M.; SILVA, J.S.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1113-1123, 2010.
- FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F. de C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBSC, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p.577-596.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- 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.
- GILLIS, M.; VAN VAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K. HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to na emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.2, p.274-289, 1995.
- GORIS, J.; VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB-and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1677-1681, 2004.
- GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

- HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Cambridge Journal of Microbiology**, v.49, p.781-787, 2003.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.
- HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.15-54.
- JACOBONI, N.; BATTAGLINI, M.; PERZIOSI, P. Propagación del olivo. **Olivicultura moderna**. Madrid: FAO-INIA, p.150-169, 1976.
- KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.91-100, 2006.
- 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 and Biochemistry**, v.36, p.1229-1244, 2004.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- 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**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- LIVRAMENTO, D.E.; OLIVEIRA, A.F. Ecofisiologia da oliveira, alguns aspectos de fotossíntese, temperatura e radiação solar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.231, p.27-32, 2006.
- LORENZI, H.; BACHER, L.B.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.
- LOUSSERT, R.; BROUSSE, G. **El olivo**. Madrid: Mundi Prensa, 1980. 533p.
- MAGALHÃES, F.M.M. **Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio**. 1983. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 1983.
- MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.
- MARQUES JUNIOR, R.B.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G.; OLIVARES, F.L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1121-1128, 2008.
- MAYER, N.A. **Propagação assexuada do porta-enxerto umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estacas herbáceas**. 2001. 109p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

- McCUNE, B.; MEFFORD, M.J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.12. Glenden Beach: MjM Software, 1997.
- MEHNAZ, S.; KOWALIK, T.; REYNOLDS, B.; LAZAROVITS, G. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and Field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.1848-1856, 2010.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopatológica**, v.28, p.222-228, 2002.
- MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.85-93, 2004.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U.G.; PARK, K.D.; JEON, W.T.; CHO, C.Y.; KWON, S.W.; SONG, J.; ROH, D.H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.981-991, 2007.
- 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**, v.28, p.269-279, 2004.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.12, p.1591-1601, 1994.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; JAMES, E.K.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease and resistant sugar varieties by endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v.135, p.723-737, 1997.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophic *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p.197-200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BUENO, F.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26, 1993, Aracaju. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.313, 1993. Suplemento. Resumo.
- OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. 1992. 96p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1992.
- 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.
- OLIVEIRA, A.F.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da oliveira (*Olea europaea* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.231, p.13-17. 2006.

- OLIVEIRA, A.F.; PÁDUA, J.G. **Cultura da Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002.
- OLIVEIRA, A.F.; VIEIRA NETO, J.; ALVARENGA, A.A.; MESQUITA, A.D.; GONÇALVES, E.D. **Propagação da oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas**. Belo Horizonte: EPAMIG, v.1, 2008, 48p. (EPAMIG, Boletim Técnico, 90).
- OLIVEIRA, A.F.; VIEIRA NETO, J.; OLIVEIRA, D.L. de. **Diferentes substratos e volumes de recipientes, na produção de mudas de oliveira (*Olea europaea* L.)**. (Apresentação de Trabalho/Congresso), 2007.
- OLIVEIRA, AL.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.106-113, 2009.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DOEBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 242, n.2, p. 205-215, may. 2002.
- OLIVEIRA, G.J. (2010). **Produção e consumo de azeites e azeitonas**. Disponível em: <<http://www.olivicultura.com.br/default.asp?MENU=15>>. Acesso em 21 agosto 2010, 15:30h.
- 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, 2010a.
- OLIVEIRA, M.C.; VIEIRA NETO, J.; PIO, R.; OLIVEIRA, A.F.; RAMOS, J.D. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras/UFLA, v.34, n.2, p.337-344, mar./abr., 2010b.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D.; VALE, M.R. do; SILVA, C.R. de R. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137p.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacteria biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.
- PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*)**. 2009. 74p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2009.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, v.174, p.23-28, 1995.
- PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.827-834, 2003.
- PERIN, L.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V.M. **O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 32p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 219).

- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.C.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.61-65, 1991.
- PIO, R.; BASTOS, D.C.; BERTI, A.J.; SCARPARE FILHO, J.A.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; ENTELMANN, F.A.; ALVES, A.S.R.; BETTIOL NETO, J.E. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras/UFLA, v.29, n.3; p.562-567, 2005.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE ITAJUBÁ. **Elaboração do Plano de Manejo**: Reserva Biológica Serra dos Toledos. Itajubá, Documento apresentado ao Fundo Nacional do Meio Ambiente Edital 10/2001: Apoio à Gestão Integrada em Unidades de Conservação de Proteção Integral de Reservas Particulares do Patrimônio Natural (Adminitração 2001-2004), 2002.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RAPOPORT, H.F. Botánica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, RALLO, L (Ed.). **El cultivo del olivo**. 2.ed. rev. y amp. Servilha: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía/Madrid: Mundi-Prensa, 1998. p.35-60.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.1, p.43-51, 1987.
- REIS, V.M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Arobiologia, 2007. 22p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 232).
- 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, v.54, p.2155-2162, 2004.
- REIS JÚNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.32, n.3 , p.1139-1146, 2008.
- REYMENT, R.; JÖRESKOG, K.G. **Applied factor analysis in the natural sciences**. London: Cambridge University Press, 1993.
- RODRIGUES, E.P.; RODRIGUES, L.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yeld and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v.302, n.1-2, p. 249-261, jan., 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.

- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.
- ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.1201-1204, set./out., 2005.
- ROLIM, L.; SANTOS, A.B.; MACHADO, C.T.T.; MENDES, I.C.; MACHADO, A.T.; REIS JUNIOR, F.B. Produção de ácido indolacético e promoção do crescimento de plantas de milho por estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum Amazonense*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO: SOLOS, SUSTENTABILIDADE E QUALIDADE AMBIENTAL, 33, Recife, 2005. **Anais**. Recife, 2005. CD-ROM.
- SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.
- SEBASTIANI, L.; TOGNETTI, R. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs ‘Frantoio’ and ‘Gentile di Larino’) cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, n.1-4, p.75-82, 2004.
- 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.; 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**, v.35, n.2, p.359-371, 2011.
- SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v.312, p.15-23, 2008.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.12, p.15-22, 1982.
- TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.305-316, 2001.

- VANDE BROEK, A.; DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; VANDOMMELEN, A. *Azospirillum*-plant interactions: signaling and metabolic interactions. In: TRIPPLET, E.W., ed. **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Wymondham: Horizon Science, 2000. p.761-777.
- VIEIRA NETO, J.; CANÇADO, G.M.A.; OLIVEIRA, A.F.; MESQUITA, H.A.; LÚCIO, A.D.; SILVA, L.F.O. Fertilizantes na produção de mudas de oliveira 'Arbequina'. **Scientia Agraria**, v.11, n.1, p.49-55, 2010.
- VIEIRA NETO, J.; OLIVEIRA, A.F.; OLIVEIRA, N.C.; DUARTE, H.S.S.; GONÇALVES, E.D. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. 1ª ed. Belo Horizonte: EPAMIG, v.1. p.10-14, 2008.
- WALTER, H.; BRECKLE, S.W. **Ökologische Grundlagen in globaler Sicht**. 2., bearb. Aufl. Stuttgart: Fischer, 1991. 238S.
- WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2277-2285, 2000.
- WEI, G.H.; ZHANG, Z.X.; CHEN, C.; CHEN, W.M., JU, W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. **Microbiological Research**, v.163, p.651-662, 2008.
- 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**, 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**, v.16, p.423-432, 2003.
- ZAKHAROVA, E.A.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.H.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.

9. ANEXO

ANEXO 1. Médias dos atributos relacionados à avaliação do potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira pela inoculação de BDNS

Tratamentos*	Atributos*									
	PEM	PEC	PECE	NMR	CMR	PEF	NMF	PEB	NMB	CMB
GrapG1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GrapG2	60	40	0	0	0	80	2,75	0	0	0
GrapG3	100	0	0	0	0	20	3	0	0	0
GrapG4	100	0	0	0	0	40	1	0	0	0
GrapG5	100	0	0	0	0	20	1	0	0	0
GrapAbr	60	40	50	1	0,48	0	0	40	2,5	1,15
GrapAam	20	80	75	3,33	2,29	60	1	80	1,25	1,19
GrapHsp	80	20	0	0	0	20	1	0	0	0
GrapBbr	40	60	67	1,5	1,1	20	4	60	1,67	1,66
GrapHrm	80	20	100	6,5	2,25	80	1,75	20	1	1,9
GrapCtr	80	20	0	0	0	40	2,5	0	0	0
ArbG1	60	40	100	4	1,72	40	2	20	1	1,05
ArbG2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ArbG3	80	20	0	0	0	40	2	20	1	0,6
ArbG4	60	40	100	2	1,2	40	2	60	2,33	0,94
ArbG5	80	20	0	0	0	40	1,5	0	0	0
ArbAbr	40	60	33	6	5,98	80	3,5	0	0	0
ArbAam	100	0	0	0	0	20	2	40	2	1,2
ArbHsp	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ArbBbr	40	60	0	0	0	60	1,67	20	4	0,77
ArbHrm	80	20	100	3,5	2,96	80	2,75	0	0	0
ArbCtr	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AscG1	80	20	0	0	0	20	1	0	0	0
AscG2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AscG3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AscG4	60	40	0	0	0	0	0	0	0	0
AscG5	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0
AscAbr	40	60	0	0	0	60	1	0	0	0
AscAam	40	60	33	1	12,78	80	1,75	0	0	0
AscHsp	40	60	0	0	0	60	1,67	20	2	1,48
AscBbr	60	40	0	0	0	20	2	0	0	0
AscHrm	80	20	100	2	1,18	20	1	0	0	0
AscCtr	80	20	0	0	0	40	1	20	1	1,42

* Descrição dos tratamentos e atributos podem ser encontrados na Figura 5.2