

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ - UNIFEI**  
**MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA MICROBIOLIZAÇÃO EM ESTACAS  
SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

**Polianna de Paula Ramos**

**Itajubá (MG)**

**2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ - UNIFEI  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

POLIANNA DE PAULA RAMOS

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA MICROBIOLIZAÇÃO EM 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 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 - UNIFEI

Itajubá (MG)

2018



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

**A N E X O I**  
**FOLHA DE JULGAMENTO DA BANCA EXAMINADORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**Título da Dissertação:** "ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA MICROBIOLIZAÇÃO EM ESTACAS SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)"

**Autora:** Polianna de Paula Ramos

**JULGAMENTO**

Examinadores(as)	Conceito		Rubrica
	A = Aprovado	R = Reprovado	
1º	A		
2ª	A		
3º	A		

**Observações:**

- (1) O Trabalho será considerado Aprovado se todos os Examinadores atribuírem conceito A.
  - (2) O Trabalho será considerado Reprovado se for atribuído pelos menos 1 conceito 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.

**Este documento terá a validade de 30 (trinta) dias a contar da data da defesa da Dissertação.**

**Resultado Final:** A      **Conceito:** A      ou seja, Aprovado.

**Observações:** \_\_\_\_\_

Itajubá, 14 de março de 2019.

**Prof. Dr. Gustavo Magno dos R. Ferreira**  
1º Examinador – UFLA

**Prof.ª Dr.ª Maria Rita R. e Almeida**  
2ª Examinadora – UNIFEI

**Prof. Dr. Rogério Melloni**  
3º Examinador (Orientador) - UNIFEI

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos demonstrando minha gratidão a Deus por sempre me abençoar e permitir ter oportunidades como essa, e a Virgem Maria por sempre interceder a Deus por mim.

Agradeço a Universidade Federal de Itajubá por todo ensinamento, suporte, incentivo para que pesquisas como essa continuem sendo cada vez mais realizadas e auxílio para que fosse apresentada parte desse trabalho no ALAM 2018- XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, em Santiago, Chile. Experiência inesquecível e de grande valia na minha vida profissional e acadêmica. À Fazenda experimental de Maria da Fé (FEMF/ EPAMIG) e a todos que lá trabalham, por disponibilizar o espaço, objetos de estudo e material necessário para realização do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Meu muito obrigado a CAPES pelo auxílio.

Agradeço, também, ao meu orientador, Prof. Rogério Melloni, por toda disponibilidade, paciência, ensinamentos, incentivo e ajuda para que esse trabalho fosse concluído e realizado com sucesso. Dessa forma, tornou-se um grande amigo e exemplo de profissional para mim.

Agradeço a toda minha família por sempre me apoiar em todas as minhas decisões e estarem ao meu lado em todos os momentos. Em destaque, mãe Valdete e avó Aparecida, que sempre acreditaram em meu potencial me encorajando a seguir meus sonhos, mesmo que pareçam distantes. Não poderia deixar de agradecer meu avô, o qual muito fez por mim e pela minha educação ao longo de sua vida e que, mesmo não estando mais entre nós e não estando presente para comemorar comigo, sei que está orgulhoso por mais essa conquista na minha vida. Ao meu pai por todo apoio e torcida sempre.

Ao meu namorado, Guilherme, por sempre me encorajar, por todo amor, atenção, apoio, paciência e companheirismo durante esses dois anos de mestrado.

Aos colegas e amigos que fiz dentro da UNIFEI que muito me ajudaram. Em especial a Thais Costa, Nara, Thais Gabriela, que muito me ajudaram em diversos momentos ao longo dessa jornada e que se tornaram amigas que levarei o resto da vida em meu coração. Também agradeço à minha grande amiga Mábele, que muito me apoiou, ajudou e encorajou a ingressar nesse novo desafio.

A todos meus velhos, bons e eternos amigos, que estão sempre ao meu lado para me aconselhar, alegrar e sempre torcer por mim, vocês são muito importantes para mim.

Ao técnico Paulo Sérgio Marques, por toda ajuda que me deu durante meu estágio e sempre disponível para as necessidades ao longo do desenvolvimento do trabalho, e Haroldo Felipe da Costa e Willians César da Silva (que do céu olha por nós) por toda ajuda e prontidão. A todos os professores do programa que tanto me ensinaram e engrandeceram meus conhecimentos. Por fim, gostaria de agradecer aos alunos Sarah e Marcelo, que participaram do programa BIC Jr. e que muito me auxiliaram nas análises. À prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Rita e Gustavo Reis por toda contribuição e ajuda para a continuação do trabalho e por aceitarem fazer parte da banca de qualificação.

Só tenho a agradecer a todos, pois eu não seria metade do que sou hoje sem essas pessoas e nada seria possível sem a ajuda de cada um. Por todo conhecimento, todo aprendizado, desafios e tudo que vivi, serei eternamente grata. Foi uma experiência que serviu para meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada!

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”*

*Roger Von Oech*

## RESUMO

A busca pelos produtos provenientes da oliveira (*Olea europaea* L.) vem aumentando em todo mundo, e o Brasil encontra-se entre os maiores consumidores e importadores desses produtos, o que incentiva estudos relacionados ao seu cultivo no país. Na produção de mudas de oliveira, a estaquia é o método de propagação vegetativa mais utilizado em todos os países produtores. Atualmente, para indução do enraizamento dessas estacas utilizam-se hormônios sintéticos, como o ácido indolbutírico (AIB), porém as formulações são proibidas em diversos países, por serem prejudiciais à saúde humana e à planta em determinadas concentrações. Uma alternativa natural é a utilização de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) capazes de produzir hormônio indutor de enraizamento, o ácido indolacético (AIA). O objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial de produção de AIA de isolados de rizobactérias obtidos da rizosfera de oliveiras e sua eficiência na promoção de enraizamento de estacas durante a produção de mudas. Para isso, amostras de rizosfera de 17 diferentes cultivares de oliveira, do banco de germoplasma da EPAMIG, em Maria da Fé- MG, foram utilizadas para o isolamento de RPCP em meios de cultura JNFb, NFb e LGI, as quais foram caracterizadas fenotipicamente em meio potato dextrose e submetidas ao teste de produção de AIA. Entre as maiores produtoras de AIA, quatro foram utilizadas para inoculação nas estacas de oliveira para avaliar sua eficiência no enraizamento, no período de 70 dias. A maior quantidade de bactérias por cultivar foi obtida nos meios JNFb e NFb. Na caracterização fenotípica, os isolados de RPCP apresentaram alta similaridade entre si (93% a 100%), refletindo em um baixo índice de diversidade de Shannon-Weaver. Quanto à produção de AIA, esses isolados apresentaram boa produção (0,16 e 29,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) quando comparados a outros estudos, mesmo sem a adição de triptofano ao meio de cultura, sendo os isolados obtidos no meio JNFb os maiores produtores. Apesar da baixa porcentagem de enraizamento, os isolados GLJ2 e AUSAL3 apresentam potencial de serem utilizados em pesquisas futuras visando à produção de inóculo para a cultivar de oliveira Grappolo 541.

Palavras-chave: Inoculante. Enraizamento. Hormônios. Ácido-indolacético.

## ABSTRACT

The search for products from olive (*Olea europaea* L.) has been growing around the world, and Brazil is between the largest consumers and importers of these products, which encourages related studies to their cultivation in the country. For the seedling production, the stem cutting is the most used vegetative propagation method in all producing countries. Actually, for induction of rooting of cuttings synthetics hormones are used, for example, indole-3-butyric acid (IBA), however, these formulations are forbidden in some countries, because of they can be harmful to human health and plants in some concentrations. A natural alternative is to use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) capable of producing rooting inducing hormone, the indole-3-acetic acid (IAA). The aim of this study is evaluating the production potential of IAA of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of olive trees and their efficiency in the promotion of rooting of cuttings during the seedlings production. For this, samples of the rhizosphere of 17 different olive cultivars, the germplasm bank of EPAMIG, in Maria da Fé- MG, were used for the isolation of PGPR in culture medium JNFb, NFb e LGI, which were characterized phenotypically in potato dextrose agar and submitted to production test of IAA. Among the largest producers of IAA, four were used to inoculation in cuttings to evaluate your rooting efficiency, in the period of 70 days. The largest amount of bacterias per cultivars was obtained in the medium JNFb e NFb. On phenotypic characterization, the isolates of PGPR showed high similarity to each other (93% to 100%), reflecting in a low diversity of Shannon-Weaver. About the IAA production, these isolates showed good production (0,16 to 29,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) when compared to other studies, even without the addition of tryptophan to the culture medium, and the isolates obtained in JNFb medium the most lag producers. Even with low percentage of rooting, the isolates GLJ2 and AUSAL3 showed potential for use in future research aimed at the production of inoculum to the cultivar of olive Grappolo 541.

Keys words: Inoculant. Rooting. Hormones. Indole acetic acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Esquema das etapas realizadas no presente estudo na metodologia.....	27
<b>Figura 2-</b> Localização do município de Maria da Fé, Sul de Minas Gerais. ....	28
<b>Figura 3-</b> Banco de germoplasma da Fazenda Experimental de Maria da Fé - FEMF/EPAMIG. ....	29
<b>Figura 4-</b> Amostra das rizosferas nos sacos plásticos identificados (A) e peneiramento das amostras em laboratório (B). ....	31
<b>Figura 5-</b> Pesagem das amostras de rizosfera das oliveiras do banco de germoplasma submetidas à análise de umidade.....	31
<b>Figura 6-</b> Meios semi-sólidos com formação de película bacteriana próxima à superfície do meio. ....	32
<b>Figura 7-</b> Transferência das rizobactérias do meio semi-sólido para o meio sólido (a); Meio sólido NFb após 7 dias sob incubação (B). ....	33
<b>Figura 8-</b> Isolados em meio potato dextrose para serem caracterizados com o auxílio de um microscópio digital. ....	34
<b>Figura 9-</b> Meios de cultura inclinados inoculados com rizobactérias para utilização na etapa de quantificação de AIA e armazenamento. ....	35
<b>Figura 10-</b> Meio líquido Dygs inoculado sob agitação para crescimento das rizobactérias (A); Tubos com 20 mL das suspensões para primeira centrifugação (B); Tubos após centrifugação antes do descarte do sobrenadante, com o precipitado de células (indicado pela seta) para ajuste da DO (C); Suspensões após ajuste da DO para 0,5 com solução salina 0,85% (D). ....	36
<b>Figura 11-</b> Tubos com a suspensão com adição do reagente Salkowski após 30 minutos no escuro para formação de cor (A); Suspensão positiva (direita) e solução usada como branco (esquerda) para medição da concentração de AIA através do espectrofotômetro (B). ....	37
<b>Figura 12-</b> Curva padrão das concentrações de AIA comercial para comparação com a produção dos isolados e estirpes.....	37
<b>Figura 13-</b> Diluições de 0 a 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para construção da curva padrão (A); Frascos das diluições com reagente Salkowski após 30 minutos no escuro (B).....	38
<b>Figura 14-</b> Estaca com os padrões exigidos para plantio (A); Estacas nos copos prontas para serem colocadas na casa de vegetação (B). ....	39

<b>Figura 15-</b> Areia sendo peneirada em malha de 2mm (A); lavagem da areia para retirar todas impurezas presentes (B); Após lavagem, esterilizadas em autoclaves (C); após autoclavadas colocadas nos copos para plantio (D). .....	40
<b>Figura 16-</b> Suspensões utilizadas para inoculação das estacas no agitador para crescimento das rizobactérias (A); Meio líquido Dygs controle (esquerda) e inoculado com um dos isolados (direita), após 72 horas sob agitação (B). .....	41
<b>Figura 17-</b> Estaca após realizar o microferimento com palha de aço com as estrias evidenciadas pela seta, imagem obtida com microscópio digital (aumento de 200x) (A); Estacas imersas na suspensão bacteriana e controle (B); Vasos com as estacas em casa de vegetação após os 60 minutos de imersão nas suspensões, vasos foram dispostos de forma aleatória (C). .....	42
<b>Figura 18-</b> Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura JNFb. ....	43
<b>Figura 19-</b> Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura NFb. ....	43
<b>Figura 20-</b> Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura LGI. ....	44
<b>Figura 21-</b> Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio JNFb. ....	46
<b>Figura 22-</b> Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio NFb. ....	46
<b>Figura 23-</b> Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio LGI. ....	47
<b>Figura 24-</b> Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura JNFb. ....	48
<b>Figura 25-</b> Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura NFb. ....	48
<b>Figura 26-</b> Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura LGI. ....	49
<b>Figura 27-</b> Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura JNFb. ....	51
<b>Figura 28-</b> Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura NFb. ....	51

<b>Figura 29-</b> Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura LGI. ....	52
<b>Figura 30-</b> Dendrograma de dissimilaridade (%) da produção de AIA pelos isolados obtidos nas rizosfera de oliveira em todos os meios de cultura (11 maiores produtores estão indicados com um ponto vermelho).....	54
<b>Figura 31-</b> Estacas de alguns dos diferentes tratamentos que apresentaram enraizamento positivo após 70 dias de plantio (nas laterais estão as estacas inoculadas com rizobactérias diferentes). ....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Características fenotípicas das rizobactérias avaliadas e seus respectivos números utilizados no dendrograma de similaridade .....	34
<b>Tabela 2-</b> Efeito dos tratamentos sem ferimentos e com ferimentos, respectivamente nas variáveis: Estacas enraizadas; Estacas mortas; Estacas com calo e Estacas vivas. ....	56

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Exemplos de estudos sobre a aplicação de rizobactérias em diversas culturas .....	23
<b>Quadro 2-</b> Lista das cultivares selecionadas com seus respectivos países de origem e códigos utilizados no estudo. ....	30
<b>Quadro 3-</b> Lista das cultivares mantidas e descartadas em estudo e cultivares com seus respectivos códigos utilizados no estudo. ....	45
<b>Quadro 4-</b> Isolados de rizobactérias descartados do estudo por apresentarem turbidez e ficaram fora da curva padrão com suas respectivas concentrações de AIA obtidas. ....	50
<b>Quadro 5-</b> Lista dos 11 isolados com produção $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e suas respectivas concentrações de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) .....	55

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1- Objetivo Geral .....	17
2.2- Objetivos Específicos .....	17
<b>3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>18</b>
3.1- Cultivo da oliveira ( <i>Olea europaea</i> L.) no mundo e no Brasil .....	18
3.2- Métodos de propagação vegetativa na produção de mudas de oliveira .....	19
3.3- Aplicação do ácido indolbutírico (AIB) .....	21
3.4- Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, seus benefícios e utilização .....	22
3.5- Formas de inoculação através da microbiolização em diferentes culturas .....	24
3.6- Estudos realizados no Brasil com oliveiras com a aplicação de microrganismos do solo .....	25
<b>4- METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
4.1- Descrição da área de estudo .....	28
4.2- Seleção das cultivares de oliveira e isolamento das rizobactérias .....	29
4.3- Caracterização fenotípica dos isolados de rizobactérias obtidos nas rizosferas .....	33
4.4- Quantificação da produção de AIA pelos isolados .....	35
4.5- Microbiolização e enraizamento das estacas de oliveira .....	38
4.5.1- Preparo do substrato para plantio .....	39
4.5.2- Preparo das suspensões bacterianas .....	40
4.5.3- Análise da densidade bacteriana das suspensões utilizadas como inoculante .....	41
4.5.4- Preparo e plantio das estacas .....	41
4.5.5- Análise dos resultados obtidos .....	42
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1- Resultados do isolamento e caracterização dos isolados de bactérias .....	43
5.2- Resultados da quantificação da produção de AIA dos isolados .....	50
5.3- Resultados da microbiolização das estacas com os isolados de rizobactérias .....	55
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>70</b>

## 1- INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem, amplamente cultivada no mundo e de grande importância no mercado alimentício por conta de seus produtos, o azeite e a azeitona. Além da importância econômica, esses produtos são benéficos à saúde humana, pois possuem substâncias importantes nutricionalmente, tais como ácidos graxos insaturados, vitaminas e compostos fenólicos (CAVALHEIRO et al., 2014). Os benefícios à saúde, ao se consumir diariamente esses produtos, têm sido relatados por vários pesquisadores e um exemplo de benefício promovido é a prevenção de doenças cardiovasculares (CANELA; GONZÁLEZ, 2011).

No Brasil, o cultivo de oliveira é uma atividade recente e em expansão, com destaque para as regiões sul e sudeste, em virtude dos fatores climáticos favoráveis à floração e frutificação. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para melhorar a produção e o comércio nacional a fim de reverter o quadro de dependência que o país vive, já que importa todo azeite de oliva e azeitona que consome, não dispõe de volume suficiente para atender a população, além de baixa expressividade e tecnologia para competir com os concorrentes internacionais. Com isso, o preço desses produtos, principalmente do azeite, é considerado caro e, em função disso, nem todos conseguem ter acesso a esses produtos nem aos seus benefícios (BALLUS et al., 2014).

Um fator que pode melhorar o desenvolvimento das plantas de oliveira é a utilização de cultivares melhoradas, juntamente com técnicas de manejo baseadas nas condições climáticas brasileiras, pois introduzir a oliveira em um ambiente diferente do seu original tende a influenciar o seu crescimento, desenvolvimento e produção (LIVRAMENTO; OLIVEIRA, 2006).

No entanto, a maioria dos estudos desenvolvidos é direcionada ao manejo e produção e poucos tratam de métodos alternativos na produção de mudas, o que limita informações a esse respeito. Utilizar microrganismos no processo de produção biotecnológica vem sendo estudada em outras culturas como milho, eucalipto, potato dextrose, soja, banana, arroz, com resultados promissores no desenvolvimento e crescimento das plantas.

Um exemplo de microrganismo a ser utilizado são as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), que são capazes de proporcionar um melhor desenvolvimento às plantas por meio de mecanismos como suplementação de nutrientes que possam estar em baixa disponibilidade ou inibindo o desenvolvimento e ação de pragas e patógenos, produção de reguladores do crescimento vegetal, produção de fitohormônios produzindo antibióticos e

antifúngicos, que induzem o enraizamento e crescimento vegetal (ácido indolacético-AIA) (CARDOSO; ANDREOTE, 2016), sendo essa uma estratégia que pode ser explorada no processo de propagação vegetativa.

A utilização dessas rizobactérias pode ser uma alternativa promissora e natural de melhoria para a cultura de oliveira, já que, atualmente, para produção de mudas o método de propagação vegetativa utilizado é a estaquia de estacas semilenhosas, com aplicação de hormônio sintético, ácido indolbutírico (AIB) para indução de enraizamento. No entanto, a utilização dessas formulações sintéticas, além de proibida em diversos países, ainda apresenta riscos à saúde humana (ERTURK et al., 2010).

Existem muitos estudos que tratam da produção de mudas de oliveira com a utilização de AIB, porém poucos são relacionados à aplicação de microrganismos do solo, como as rizobactérias. Esses microrganismos apresentam capacidade de produção natural de hormônios e de promover outros benefícios à planta, porém, atualmente existe uma lacuna relacionada à forma de inoculação dessas bactérias nas estacas, aliada à uma falta de estudos de sua aplicação na produção de mudas e/ou crescimento de oliveira.

Nesse sentido, o presente estudo pode ser considerado de grande importância na produção de mudas de oliveira, em condições brasileiras, pelo fato de ser uma alternativa ao processo atualmente vigente de enraizamento, prática já consolidada em outras culturas, com ganhos ambientais significativos.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo Geral**

Avaliar o potencial de produção de AIA por rizobactérias (RPCP), obtidas na rizosfera de oliveiras e sua capacidade de promover o enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira, durante o processo de produção de mudas.

### **2.2- Objetivos Específicos**

- Isolar e caracterizar fenotipicamente rizobactérias presentes no banco de germoplasma.
- Determinar a produção de ácido indolacético (AIA) dos isolados de rizobactérias.
- Analisar o potencial de enraizamento de estacas por meio da inoculação das rizobactérias de maior produção de AIA sob diferentes formas de inoculação.

### 3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1- Cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.) no mundo e no Brasil

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta característica da região Mediterrânea, pertence à família Oleaceae, apresentando mais de trinta gêneros (COUTINHO et al., 2015). Apresenta-se em tamanho médio e formato arredondado com porte, densidade da copa, comprimento de entrenós e cor da madeira variando em função da cultivar e condição de cultivo (OLIVEIRA, 2009a).

O cultivo da oliveira, denominada olivicultura, tem sido realizado em todos os continentes, em regiões de clima subtropical ou temperado, necessitando de baixas temperaturas no período de floração para ocorrência de produções satisfatórias (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009). A olivicultura foi disseminada em diversos países, passando a ser conhecida e apreciada por todo o mundo pela produção de azeitona e azeite de oliva (SANTOS et al., 2015).

A busca e a importância econômica desses produtos se devem aos benefícios para saúde, tanto da azeitona quanto do azeite, por conterem substâncias importantes como ácidos graxos insaturados, vitaminas A, E e K, e compostos fenólicos, com diversos benefícios ao coração, pele, olhos, ossos e sistema imune (CAVALHEIRO et al., 2014; TOFOLI et al., 2013). Diante deste fato, o cultivo comercial desperta grande interesse no agronegócio e em setores organizados da agricultura, como cooperativas e associações de produtores.

Para que o azeite de oliva possa ser comercializado é necessário estar classificado dentro dos padrões vigentes baseados em análises físico-químicas da aparência, acidez (em ácido oleico), índice de peróxido, índice de iodo e índice de refração absoluto a +20 °C. Essas características variam, normalmente, com relação ao solo, clima, práticas culturais, variedades, estado de maturação do fruto, entre outras (CANÇADO et al., 2013; FOSSATI, 2015; PESTANA-BAUER; GOULARTE-DUTRA; ZAMBIAZI, 2011). Um azeite que apresenta um grau de acidez menor de 0,8% é classificado como Extra Virgem, sendo considerado de altíssima qualidade e pode ser vendido direto ao consumidor sem sofrer qualquer tipo de refino químico. Sendo considerado o mais saudável e completo entre todos os azeites (OLIVEIRA et al., 2010a).

Segundo Vilar e Pereira (2018), os principais países produtores de azeite de oliva (percentagem na produção mundial) são: Espanha (49,12%), Itália (14,15%), Grécia (9,17%), Tunísia (6,71%), Turquia (5,43%), Síria (4,82%), Marrocos (4,64%), Portugal (3,19%), Argélia (2,38%) e Estados Unidos (0,38%). Na produção de azeitona de mesa destacam-se

Espanha (28,86%), Turquia (20,32%), Egito (19,80%), Argélia (11,06%), Marrocos (5,58%), Peru (3,45%), Irã (3,27%), Estados Unidos (3,11%), Itália (2,96%), Jordânia (1,49%).

O Brasil é um grande importador de azeite de oliva e está posicionado entre os 10 países de maior consumo de azeite no mundo (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, 2018). Dados da Companhia Nacional do Abastecimento (INDICADORES DA AGROPECUÁRIA, 2017) mostram que, em 2016, nos meses de janeiro a setembro, foram importadas, aproximadamente, 38 mil toneladas de azeite de oliva, movimentando um montante de quase US\$ 186 milhões.

Na América do Sul, os países que mais se destacam como produtores e exportadores são Argentina e Chile, respectivamente, com 100 mil e 10 mil hectares plantados (SILVA et al., 2012a). O cultivo de oliveira no Brasil é uma atividade em expansão, onde o cultivo de pomares em escala comercial começou a menos de uma década. Trabalhos relacionados à olivicultura passaram a ser realizados nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, com intuito de melhorar o comércio nacional e, atualmente, a Serra da Mantiqueira apresenta uma produção com cerca de 300 mil oliveiras, sendo que a cultivar Arbequina representa cerca de 50% dessa produção (SILVA et al., 2012a).

Na Serra da Mantiqueira, o Núcleo Tecnológico Epamig Azeitona e Azeite, em Maria da Fé (MG), vem desenvolvendo pesquisas com a oliveira buscando reverter o quadro de dependência das importações. Atualmente, possui genótipos de diferentes origens, que apresentam produção regular de frutos e azeite de excelente qualidade, classificados como extravirgem e de baixa acidez, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

No Núcleo Tecnológico de Maria da Fé existe um banco de germoplasma que foi instalado em 2005, com 70 genótipos diferentes de oliveira. Essas plantas foram conduzidas livres em campo, apenas realizando podas para limpeza de ramos mal posicionados (SILVA et al., 2012b). Esse banco possibilita que essas plantas sejam estudadas para melhoramento genético ou para melhoramento da produção em Minas Gerais. Possuir bancos de germoplasma são meios de assegurar patrimônio genético das espécies, permitem o estudo de diversas cultivares, de diferentes origens, sob as mesmas condições de cultivo (SILVA et al., 2012b).

### **3.2- Métodos de propagação vegetativa na produção de mudas de oliveira**

Além dos bancos de germoplasma que possibilitam manter as características genéticas das cultivares, outra forma é através da propagação vegetativa, considerada uma alternativa

viável de produção de mudas para manter a uniformidade genética das plantas (SILVA et al., 2012c; SMARSI et al., 2008). Um método de propagação muito utilizado é a estaquia. No entanto, a viabilidade desse método depende da capacidade de cada espécie de planta de formar raízes adventícias, da qualidade do sistema radicular que foi formado e de como essas plantas se desenvolvem na área de produção (FACHINELLO et al., 1995).

A estaquia permite explorar o potencial das plantas de regenerarem raízes por meio de um segmento de ramos ou de raízes, proporcionando homogeneidade na produção, já que para fins de comercialização devem-se apresentar plantas uniformes, bem formadas e frutos com características botanicamente e agronomicamente bem definidas (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005; OLIVEIRA, 2009a).

Na olivicultura, o método de propagação vegetativa utilizado até o final do século XX, foi a estaquia com estacas lenhosas de 60 cm de comprimento, que eram inseridas diretamente na cova de plantio. Porém, esse método apresentava desvantagens, como o tamanho do propágulo, tempo para formação da muda, sobrecarregando o processo de multiplicação em larga escala, por haver gasto excessivo de material, e a coleta que eram feitas apenas uma vez ao ano (OLIVEIRA et al., 2010b).

Com isso, o método por estaquia foi modificado e atualmente é realizada com estacas semilenhosas de 12 cm, com 4 folhas, sob nebulização e tratamento hormonal com ácido indolbutírico (AIB) na concentração de  $3 \text{ g L}^{-1}$  antes do plantio (OLIVEIRA et al., 2010b), para desenvolvimento de raízes. Dessa forma, a propagação vegetativa por estaquia vem a ser a técnica mais eficaz no processo de formação de mudas, pois é capaz de manter as características genéticas das plantas matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

Na estaquia, aplicar reguladores de crescimento, muitas vezes, é fundamental na formação de raízes tendo por finalidade aumentar a porcentagem de estacas que formam raízes, acelerar sua iniciação, aumentar o número e a qualidade das raízes formadas e uniformizar o enraizamento (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005). Porém, com a proibição de formulações sintéticas de reguladores de crescimento vegetal na indução de enraizamento, como por exemplo, o AIB, na agricultura orgânica, incentivaram-se estudos com sistemas alternativos para o melhoramento de enraizamento natural (ERTURK et al., 2010).

Segundo Oliveira et al. (2009b), mesmo a oliveira possuindo fruto com semente viável, não é recomendada a reprodução sexual para plantios comerciais. Isso porque há uma segregação genética, onde origina indivíduos com características distintas da planta-matriz,

longo período juvenil, onde as folhas são mais grossas e curtas e não produzem frutos por muito tempo, pelo menos oito anos.

Além desses métodos, pode-se considerar a enxertia para propagação de espécies que não se adaptam aos outros métodos ou acelerar o crescimento de alguma planta. Entretanto, faltam mais estudos sobre esse método em oliveira e protocolo para o sucesso da obtenção de mudas por meio da enxertia já que algumas cultivares não mostraram resultados satisfatórios como um crescimento excessivo no ponto de enxertia, a produção de frutos inaptos, entre outros problemas observados (OLIVEIRA, 2009a).

### **3.3- Aplicação do ácido indolbutírico (AIB)**

A utilização de AIB na estaquia de oliveira tem sido considerada prática fundamental para o enraizamento. Nesse sentido, a aplicação do hormônio sintético AIB tem possibilitado aumentar a produtividade de algumas espécies vegetais e, conseqüentemente, o lucro obtido. Entretanto, sua utilização em determinadas concentrações pode causar toxidez a planta ou efeito inibitório ao enraizamento (TOFANELLI, 1999; WENDLING; XAVIER, 2005).

Nos Estados Unidos, por exemplo, o AIB é registrado como pesticida bioquímico pela *Environmental Protection Agency* (EPA), sendo esse obrigatório para sua utilização no cultivo de plantas, exigindo que todos seus componentes sejam divulgados (TECHNICAL SERVICES BRANCH FOR THE USDA NATIONAL ORGANIC PROGRAM, 2011).

Existem diversos estudos relacionados ao cultivo de oliveira no Brasil referentes à produção, manejo e enraizamento de estacas de oliveira com a utilização do hormônio sintético AIB (CAPPELLARO, 2013; OLIVEIRA et al., 2009b; PIO et al., 2005; SILVA et al., 2012c). Porém, quando se trata da utilização de microrganismos do solo (como as RPCP), na produção de mudas de oliveira, ainda são poucos os estudos relacionados, tanto no Brasil (MARIOSIA et al., 2017; SILVA et al., 2017), quanto no mundo (EL TAWHEEL; OMAR; SHAHEEN, 2014; MONTERO-CALASANZ et al., 2013; PEYVANDI et al., 2010; SCHILIRÒ et al., 2012).

O desenvolvimento de inoculantes com RPCP pode contribuir com a agricultura sustentável, não somente no âmbito de reduzir o uso de fertilizantes e agrotóxicos no campo (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009), devido às propriedades biofertilizantes e biopesticidas das rizobactérias (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012), mas também aliando a sua capacidade fitoestimuladora na indução do enraizamento adventício, já que os efeitos ambientais e na saúde humana provenientes da utilização do

hormônio sintético AIB não são suficientemente conhecidos (NATIONAL ORGANIC STANDARDS, 2013).

### **3.4- Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, seus benefícios e utilização**

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são bactérias que podem ser encontradas na rizosfera, em superfícies radiculares e em associação com as raízes das plantas (AHMAD et al., 2008). Utilizar dessas rizobactérias na produção pode representar uma alternativa biológica promissora para aumentar a produtividade das culturas (MARQUES et al., 2010).

As rizobactérias são capazes de proporcionar um melhor desenvolvimento às plantas, por meio de mecanismos como suplementação de nutrientes que possam estar em baixa disponibilidade ou inibindo o desenvolvimento e ação de pragas e patógenos, produzindo antibióticos e antifúngicos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Além disso, essas rizobactérias também são capazes de produzir reguladores de crescimento vegetal, os fitormônios, bem como auxinas, giberilinas, citocininas, entre outros (CAMELO; VERA; BONILLA, 2011; DODD et al., 2010; SILVA et al., 2016; VEJAN et al., 2016).

A produção de hormônios de crescimento vegetal pelas rizobactérias apresenta relação direta com o aumento da produtividade das culturas e, um exemplo de hormônio produzido por elas e que permite esse incremento na produtividade, é o ácido indolacético (AIA). O AIA é uma auxina produzida pelas rizobactérias capaz de induzir o crescimento e formação de raízes e o aumento de pelos radiculares, possibilitando, assim, maior absorção de água e de nutrientes presentes no solo, favorecendo o crescimento vegetal (CABALLERO-MELLADO, 2006).

Outras formas de melhoria e promoção de desenvolvimento vegetal ocorrem em razão da mobilização de fósforo, inibição da síntese de etileno na planta, produção de sideróforos e antibióticos, e outros oligoelementos para absorção pelas plantas (CANELLAS et al., 2015; VAFADAR, AMOOAGHAIE; OTROSHY, 2014). As RPCPs podem ser aplicadas ao solo em formulações simples ou como inoculantes.

Existem diversos estudos que apontam promoção de crescimento por rizobactérias em diversas culturas, tais como listados no Quadro 1.

**Quadro 1- Exemplos de estudos sobre a aplicação de rizobactérias em diversas culturas.**

CULTURA	OBJETIVO DO ESTUDO	RESULTADOS OBTIDOS	AUTORES
<b>SOJA</b>	Inoculação de <i>Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii</i> com <i>Bacillus subtilis</i> em soja <sup>1</sup> . Avaliar o efeito de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no controle de fitopatógenos em sementes de soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) <sup>2</sup> .	Incrementos na nodulação, na ocupação dos nódulos pelas estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e no rendimento da soja <sup>1</sup> . Diminuição na incidência e maior controle de fitopatógenos em sementes de soja com uso de <i>Bacillus</i> spp <sup>2</sup> .	(ARAUJO; HUNGRIA, 1999 <sup>1</sup> ; BEZERRA et al., 2013 <sup>2</sup> )
<b>ALFACE</b>	Efeito dos gêneros <i>Azotobacter</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Pseudomonas</i> (strain 187) no crescimento de alface <sup>1</sup> . Efeito de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> spp. na produção orgânica de mudas e plantas de alface em estufa e campo <sup>2</sup> .	Aumento significativo no peso da planta, o número de folhas, biomassa, aumento da área foliar e rendimento da planta <sup>1</sup> . Em estufa, as mudas apresentaram aumento na matéria fresca de raízes, da parte aérea e total. No campo, não houve promoção significativa no crescimento nas plantas das cultivares <sup>2</sup> .	(CHAMANGASHT et al., 2012 <sup>1</sup> ; GOMES et al., 2003 <sup>2</sup> )
<b>MILHO</b>	Utilizar bactérias <i>Pseudomonas</i> sp. (4MKS8) e <i>Klebsiella oxytoca</i> (10MKR7) no crescimento de milho <sup>1</sup> . Efeito de rizobactérias dos gêneros <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Azospirillum</i> spp. na germinação de sementes e no crescimento e desenvolvimento do milho m campo <sup>2</sup> . Avaliar o potencial biotecnológico de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> no crescimento de soja e milho <sup>3</sup> .	Aumento do peso fresco, peso seco de raiz e altura de planta e do número de folhas <sup>1</sup> . Efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas, aumento significativo na altura das plantas, no peso de sementes e espiga, maior número de sementes por espiga e parte aérea do milho <sup>2</sup> . Incremento no desenvolvimento e a nutrição, redução do uso de fertilizantes <sup>3</sup> .	(BABALOLA et al., 2003 <sup>1</sup> ; GHOLAMI et al., 2009 <sup>2</sup> ; RATZ et al., 2017 <sup>3</sup> )
<b>ARROZ</b>	Avaliar o potencial de oito isolados de rizobactérias no controle de doenças fúngicas em arroz, DFs185 ( <i>Pseudomonas synxantha</i> ), DFs223 ( <i>P. fluorescens</i> ), DFs306 (não identificado), DFs416, DFs418 e DFs419 ( <i>Bacillus</i> sp.), DFs422 ( <i>Bacillus subtilis</i> ), DFs471 ( <i>Stenotrophomonas malthophilia</i> ) no controle de <i>Meloidogyne graminicola</i> , in vitro, e em arroz irrigado em casa de vegetação <sup>1</sup> . Investigar a ocorrência, produção de auxina, atividade nitrogenase e efeitos da inoculação de <i>A. amazonense</i> no crescimento e rendimento e contribuição na fixação biológica de nitrogênio para plantas de arroz <sup>2</sup> .	Redução do número de galhas e de ovos de <i>M. graminicola</i> em plantas de arroz. Redução da reprodução do nematoide, em até 35% <sup>1</sup> . Produção de auxina, promoção do aumento de matéria seca do grão, e de nitrogênio na maturação do grão <sup>2</sup> .	(LUDWIG; MOURA; GOMES, 2013 <sup>1</sup> ; RODRIGUES et al., 2008 <sup>2</sup> )
<b>TRIGO</b>	Avaliar o efeito do tratamento de sementes com rizobactérias nos patógenos de sementes, na germinação de sementes, no crescimento de plantas e no rendimento de grãos de trigo.	Aumento significativo na emergência de plântulas, melhora no rendimento de grãos e aumento de 18% a 22% no rendimento.	(LUZ, 2001)
<b>TOMATE</b>	Caracterização do padrão de colonização de <i>B. tropica</i> MTo293, quando mudas de tomates são inoculadas e sua a capacidade promover de crescimento das plantas em estufa.	Colonização efetiva da raiz de plantas de tomate seguido por disseminação bacteriana aos tecidos aéreos. Aumento consistente de produção de tomate em estufa em duas diferentes culturas.	(BERNABEU et al., 2015)

Entre os gêneros de rizobactérias mais estudados estão: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Serratia* e *Azotobacter* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; ARAUJO, 2008; ZAADY et al., 1993).

Com isso, a partir das capacidades das rizobactérias de promover a formação de raízes e promoção de crescimento, elas passaram a ser avaliadas em estacas de oliveira. No Brasil, Silva et al. (2017) e Mariosa et al. (2017) foram as primeiras a realizarem estudos utilizando essa capacidade das bactérias, ambas obtendo resultados positivos promissores no

enraizamento das estacas de oliveiras, quando comparados ao AIB. Porém, ainda existe uma lacuna relacionada à forma de inoculação dessas bactérias nas estacas, tema a ser abordado no presente estudo.

### **3.5- Formas de inoculação através da microbiolização em diferentes culturas**

A inoculação dos microrganismos pode ser realizada de formas diferentes, uma delas é a microbiolização, sendo o termo utilizado para o ato de recobrir sementes ou estacas com organismos que apresentam capacidade de agir no controle de patógenos associados ou promover o crescimento e desenvolvimento vegetal (JUNGES et al., 2014).

As formas de promover a microbiolização também muda entre estudos. No Brasil, Mafia et al. (2009) avaliaram diferentes formas de microbiolização de miniestacas de clones de eucalipto (diretamente no substrato; por imersão das miniestacas em suspensão de inóculo por 3 min; e pela combinação de todos os métodos), com objetivo de avaliar índice de enraizamento, a biomassa radicular e da parte aérea e a incidência de doenças.

No Brasil, outro exemplo é o trabalho realizado por Santos, Mello e Peixoto (2010), com objetivo de estudar o efeito de isolados de *Trichoderma* no enraizamento e no desenvolvimento de estacas de *Passiflora edulis* Sins f. *flavicarpa* Deg., junto ao AIB. A forma de microbiolização utilizada foi apenas imersão das estacas em suspensão de inóculo com e sem AIB, por 600 segundos e, após 90 dias, foram retiradas.

Entretanto, encontrar estudos com microbiolização em sementes são mais comuns do que em estacas e, em sua grande maioria, os resultados obtidos são satisfatórios. Alguns exemplos desses estudos são: arroz (LUDWIG; MOURA; GOMES 2013; NASCIMENTO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2008), feijão (ROCHA et al., 2016), banana (SILVA et al., 2016), milho (JUNGES et al., 2014), nabo, (JUNGLES et al., 2017) e quiabo (MOTA et al., 2017).

Além das formas de microbiolização, a realização de microferimentos possibilita um aumento da área de contato com o interior das estacas facilitando a entrada de rizobactérias, patógenos ou outros organismos, seja, por exemplo, na raiz ou colo da planta. Esses microferimentos podem ocorrer de forma natural pelo movimento natural de crescimento radicular ou por outros processos oriundos no solo (BUSATO, 2017; MENDES, 2017) ou de forma proposital como nos trabalhos de Andrade et al. (2001) e Santos (2015) que, por meio de diferentes técnicas de realização dos microferimentos, induziram a entrada de bactérias e fungos.

Com isso, a junção das duas técnicas pode aumentar a eficácia da inoculação e atuação das rizobactérias no presente estudo. Além disso, é possível notar a necessidade de mais estudos quanto à técnica de microbiolização em estacas, principalmente em oliveira, já que a maior parte dos estudos encontrados e citados anteriormente foi realizada com sementes de outras culturas.

### **3.6- Estudos realizados no Brasil com oliveiras com a aplicação de microrganismos do solo**

Como citado anteriormente, outros estudos foram realizados com aplicação de microrganismos do solo em plantas de oliveira. Os estudos realizados na Universidade Federal de Itajubá, no programa de mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos-MEMARH, que foram pioneiros aqui no Brasil, iniciaram-se com o trabalho de Vieira, Melloni e Neto (2011) objetivando avaliar a interação micorrízica em cultivares de oliveira da Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG (FEMF – EPAMIG). Os resultados obtidos comprovaram que a oliveira apresenta interação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nas condições ambientais estudadas. Com relação à distribuição dos propágulos de FMAs, os propágulos estiveram homogeneamente distribuídos nas proximidades da rizosfera das cultivares de oliveira, sem diferença significativa entre micélio extrarradicular ativo e total, densidade, diversidade de espécies e colonização radicular.

O trabalho de Ferreira et al. (2015) também foi realizado com a utilização de fungos. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da utilização de diferentes espécies de FMAs no desenvolvimento de mudas de cultivares de oliveira com potencial de cultivo na região sul de Minas Gerais. Os resultados mostraram que os FMAs proporcionaram maior massa de matéria seca da parte aérea e raiz das mudas, quando comparadas àquelas não inoculadas, principalmente para as cultivares Grappolo 541 (MGS GRAP 541) e Arbequina. A cultivar Maria da Fé (MGS MARIENSE) apresentou baixa dependência micorrízica e menor produção de matéria seca da parte aérea, comparada às outras cultivares.

O estudo pioneiro com utilização de bactérias foi de Silva et al. (2017) objetivando avaliar a diversidade fisiológica de isolados obtidos em amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos (Itajubá - MG) e o potencial de substituição do hormônio AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira na Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF-EPAMIG). Os resultados obtidos mostraram que os isolados apresentaram uma produção de AIA que variou de 110,53 a 383,58  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No enraizamento das estacas de oliveira, todos os grupos de isolados apresentaram potencial de enraizamento, onde alguns

grupos se mostraram mais indicados para as cultivares estudadas, com desempenhos semelhantes àquele proporcionado pelo AIB.

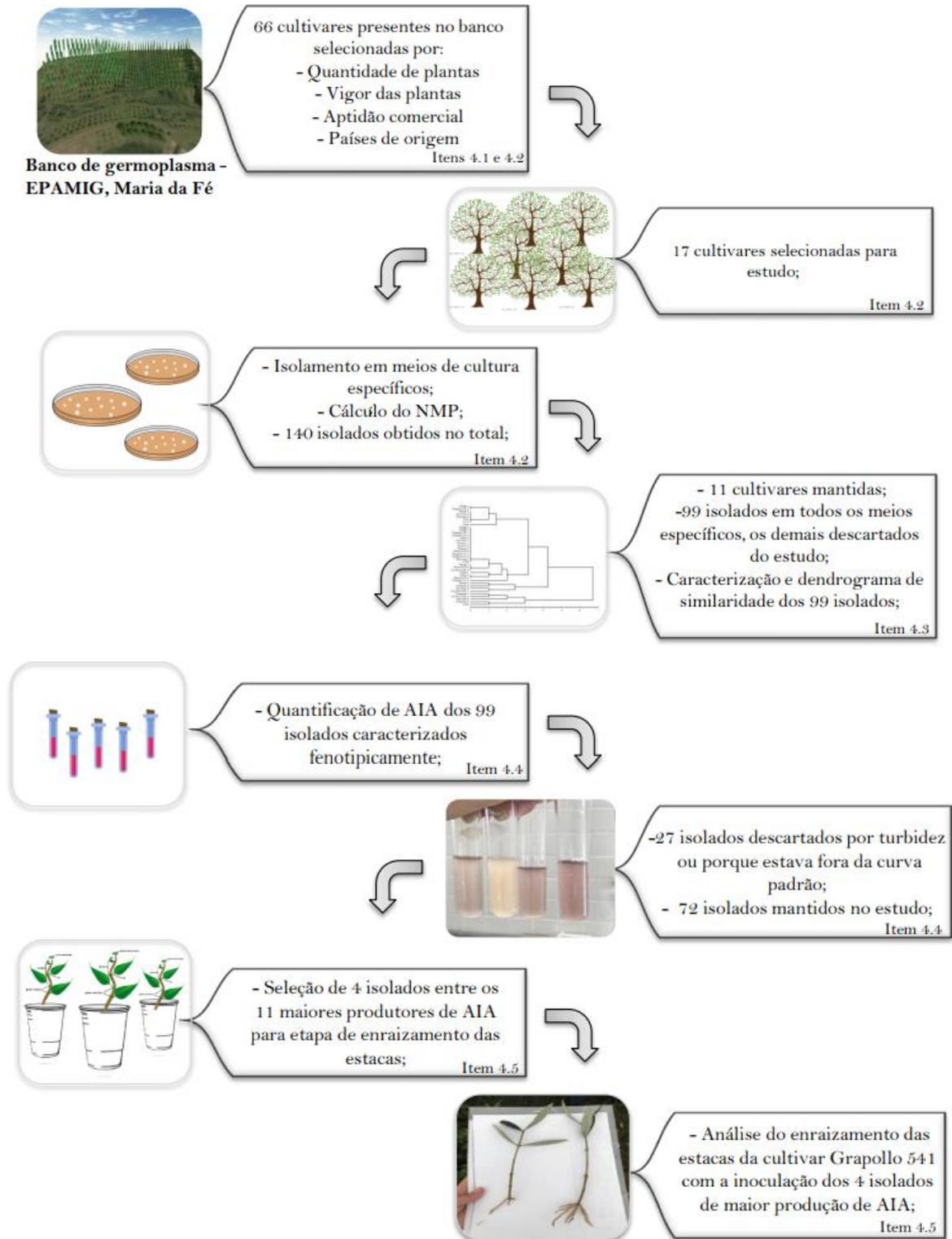
Os resultados obtidos no trabalho realizado por Silva et al. (2017) incentivaram a continuidade de estudos com a utilização de bactérias no enraizamento Mariosa et al. (2017) avaliaram o potencial de isolados de rizobactérias (32, 39, 42 e 48), obtidos no trabalho de Silva et al. (2017), de promoverem o enraizamento e desenvolvimento de mudas de oliveira, a partir de estacas semilenhosas da cultivar Grappolo 541. Como resultado, os isolados apresentaram produção de AIA *in vitro* variando de 200 a 1.406  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo os isolados 39 e 48 os maiores produtores. No entanto, não houve correlação entre produção de AIA obtida *in vitro* e o enraizamento.

O trabalho de Costa (2018) foi um dos últimos a serem concluídos no MEMARH com a utilização de microrganismos em oliveira, para avaliar o efeito da coinoculação de FMAs e rizobactérias no crescimento e desenvolvimento de mudas de cultivares de oliveira. Os resultados mostraram que a coinoculação de FMAs e rizobactérias promoveram efeito diferenciado no crescimento e desenvolvimento de mudas das cultivares de oliveira Arbequina, Maria da Fé e Grappolo 541, com destaque para a espécie *Acaulospora scrobiculata* em todas as cultivares. A combinação do FMA *Acaulospora scrobiculata* + rizobactéria *Paenibacillus* sp2. foi positiva e com potencial de uso para as cultivares, principalmente para a Arbequina, por promover maior crescimento e produção de massa seca da parte aérea das mudas.

Com base nos estudos supracitados, desenvolveu-se o presente trabalho, buscando novas formas de inoculação com isolados agora obtidos diretamente da rizosfera das próprias oliveiras.

#### 4- METODOLOGIA

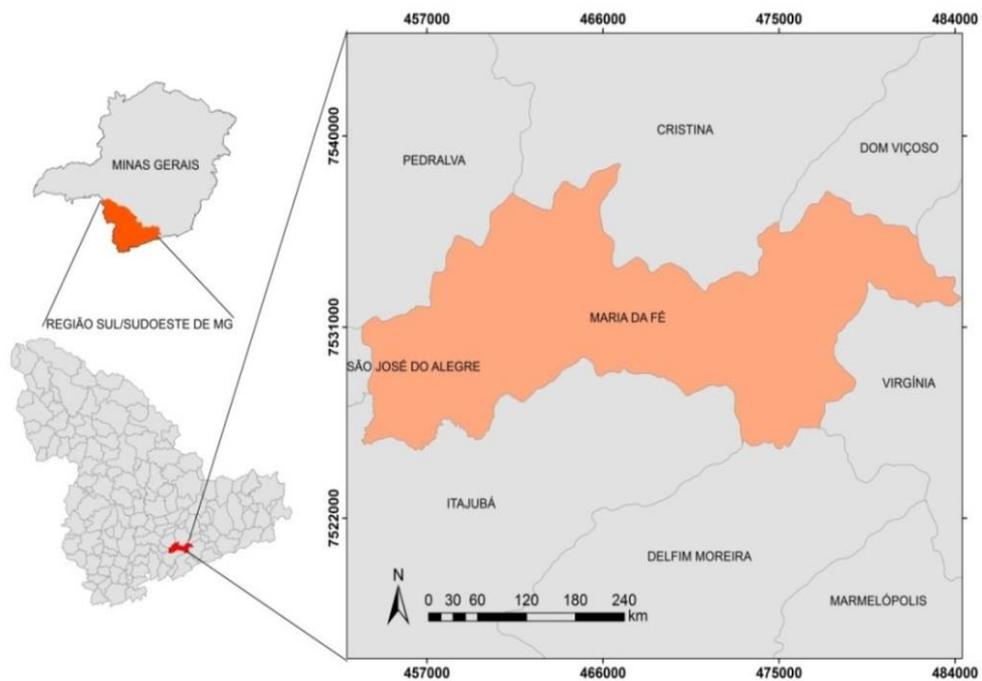
Um esquema da metodologia adotada nos estudos aqui apresentados se encontra na figura 1, os quais serão detalhados em sequência.



**Figura 1-** Esquema das etapas realizadas no presente estudo na metodologia.

#### 4.1- Descrição da área de estudo

As oliveiras utilizadas neste trabalho pertencem ao Banco de Germoplasma de Oliveira instalado no ano de 2005, situado na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Maria da Fé, Sul de Minas Gerais (Figura 2), a 22° 18' de latitude Sul e 45° 23' de longitude Oeste, altitude média de 1.276 metros e classificação climática de Köppen tipo Cwb, ou seja, clima temperado chuvoso (mesotérmico), também denominado subtropical de altitude. O solo da área de estudo é do tipo Latossolo Vermelho, com textura média argilosa (SILVA et al., 2012c). O banco (Figura 3) ocupa uma área de 1,5 ha, apresenta 66 cultivares de oliveira e, em média, seis plantas por cultivar, em espaçamento de 7 x 6 m, sendo considerado uma importante fonte genética e agrônômica do país (SILVA et al., 2012c).



**Figura 2-** Localização do município de Maria da Fé, Sul de Minas Gerais.



**Figura 3-** Banco de germoplasma da Fazenda Experimental de Maria da Fé - FEMF/EPAMIG.

#### **4.2- Seleção das cultivares de oliveira e isolamento das rizobactérias**

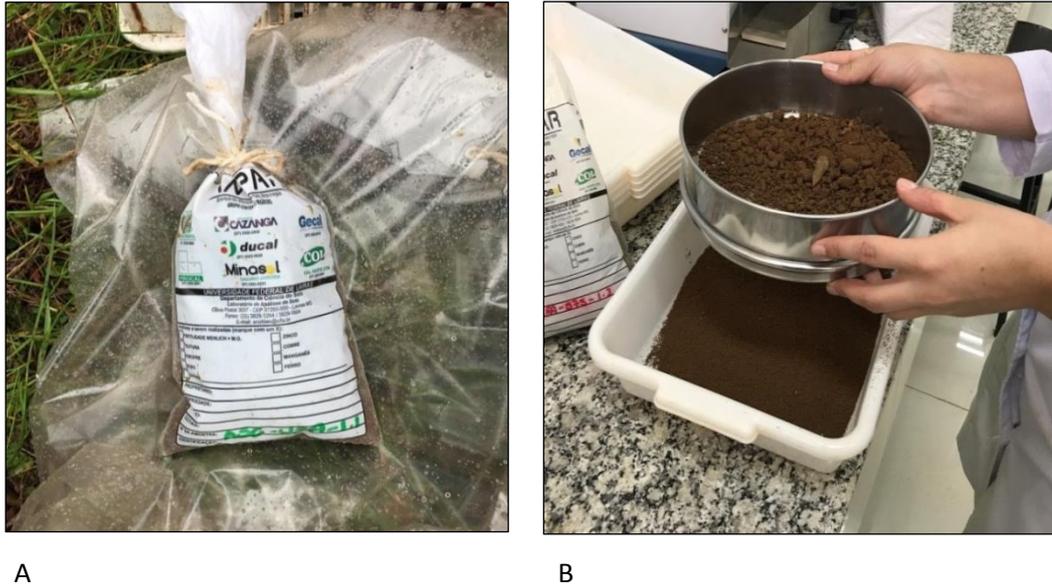
A seleção das cultivares de oliveira a serem estudadas, entre as 66 presentes, foi realizada considerando os seguintes aspectos: diferentes países de origem, quantidade (cultivares com mais de três plantas), vigor das plantas e aptidão comercial. As cultivares selecionadas para o estudo estão apresentadas no Quadro 2. Foram utilizados códigos para identificação das cultivares e também dos isolados obtidos em cada uma das cultivares

**Quadro 2- Lista das cultivares selecionadas com seus respectivos países de origem e códigos utilizados no estudo.**

CULTIVARES	PAÍS DE ORIGEM	CÓDIGO DAS CULTIVARES	CÓDIGO DOS ISOLADOS
ALTO D'ORO	ESPANHA	ALT	AD
ASCOLANA 315	ITÁLIA	ASC 315	A315
ASCOLANA USA	ITÁLIA	ASC USA	AUSA
ARBEQUINA	ESPANHA	ARBE	AQ
ARBOSANA	PORTUGAL	ARBO	AB
BARNEA	SÍRIA	BAR	BA
FRANTOIO	ITÁLIA	FRA	FT
GALEGA	ESPANHA	GAL	GL
GRAPPOLO	ITÁLIA	GRA	GR
GRAPPOLO 541	ITÁLIA	GRA 541	G54
GRAPPOLO 575	ITÁLIA	GRA 575	G57
KORONEIKI	GRÉCIA	KOR	KR
LECCINO	ITÁLIA	LECC	LC
MARIA DA FÉ	BRASIL	MDF	MF
MISSION	ESTADOS UNIDOS	MISS	MS
NEGROA	ESPANHA	NEG	NG
TAFahi 391	EGITO	TAF	TF

Após a seleção, amostras da rizosfera das cultivares foram retiradas por meio de enxada manual, desinfestada com álcool etílico 70%, em profundidade de 10 cm, em três pontos ao redor de cada planta, à distância da base de 20 cm, com procedimentos baseados no Manual de Descrição e Coleta de Solo no Campo (SANTOS et al., 2005). O delineamento utilizado no estudo foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo 3 repetições por cultivar.

As amostras da rizosfera coletada foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e peneiradas em malha de 2 mm (Figura 4) e, posteriormente, mantidas em câmara fria (5 °C) para utilização nas análises microbiológicas.



**Figura 4-** Amostra das rizosferas nos sacos plásticos identificados (A) e peneiramento das amostras em laboratório (B).

Cada amostra da rizosfera foi submetida à análise da umidade, necessária para o cálculo da quantidade de bactérias (etapa descrita a seguir). Para isso, 20 g de amostra de rizosfera foram pesadas (Figura 5) e mantidas 24 horas em estufa de secagem a 110°C até atingir peso constante, conforme Manual de Métodos e Análise do Solo (TEIXEIRA et al., 2017).

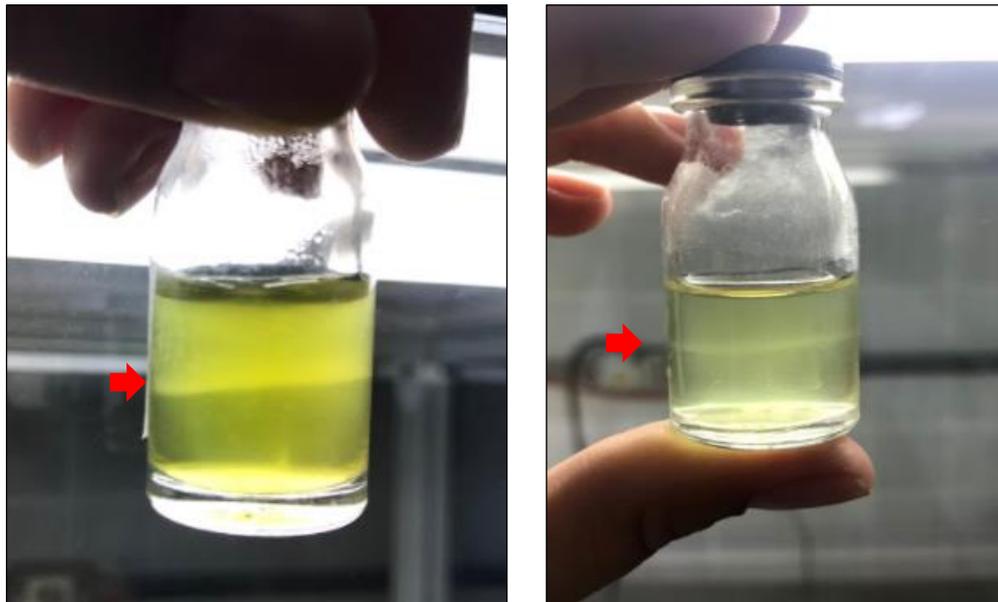


**Figura 5-** Pesagem das amostras de rizosfera das oliveiras do banco de germoplasma submetidas à análise de umidade.

Para isolamento das rizobactérias foram realizadas diluições sucessivas de 10 g das amostras de rizosfera em solução salina para diluição (DÖBEREINER et al., 1995), de  $10^{-2}$  a

$10^{-6}$ , e 0,1 mL dessas suspensões foi inoculado em frascos contendo os meios de cultura semi-sólidos específicos, sendo três repetições por diluição. Foram utilizados os meios de cultura semi-sólidos NFb para *Azospirillum* spp, JNFb para *Herbaspirillum* spp. e o meio LGI para *Azospirillum amazonense*, cujas composições estão descritas no Apêndice desse trabalho, conforme Döbereiner et al. (1995). A utilização desses meios de cultura se deve em função da ausência de meio específico para isolamento de bactérias produtoras de AIA, além do fato da importância do isolado apresentar, adicionalmente, a capacidade de fixação biológica de  $N_2$  em condições de limitação desse nutriente (KUSS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; SILVA, 2010).

Depois de inoculados, os meios semi-sólidos foram mantidos em incubação por sete dias a 28 °C, avaliando o crescimento bacteriano, a partir da formação de uma película próxima à superfície do meio (Figura 6). As quantidades dessas bactérias foram avaliadas por meio do método do número mais provável (NMP) onde, com base no número de frascos positivos para formação da película em cada diluição, foram obtidos e calculados os valores do NMP por meio da tabela em Hungria e Araújo (1994). Os valores de NMP por g de solo seco foram submetidos ao teste de comparação de médias pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008).

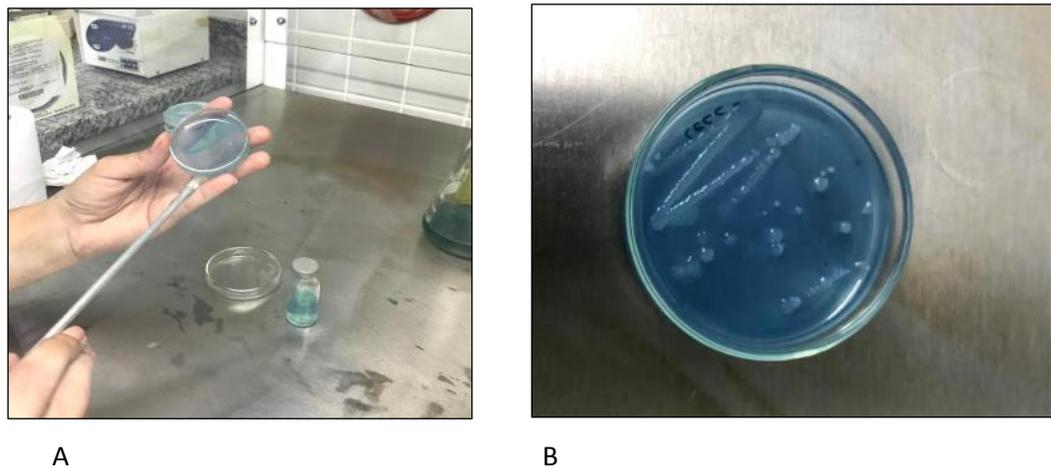


**Figura 6-** Meios semi-sólidos com formação de película bacteriana próxima à superfície do meio.

As análises estatísticas dos dados, como normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk, análise de variância e teste de comparação de médias (Scott- Knott a 5% de significância) foram realizadas a partir do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008),

utilizando log do NMP. Os valores submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk mostraram-se não normais, sendo assim realizada transformação dos dados para raiz quadrada.

Após essa etapa, uma pequena porção da película foi retirada dos vidros de diluição  $10^{-4}$ , utilizando alça de platina e transferidos para meio semi-sólido mantidos por 7 dias a  $28^{\circ}\text{C}$  e, após formação de nova película, foram novamente transferidos, porém, para placas de Petri contendo seus respectivos meios sólidos (Figura 7), conforme descrito em Döbereiner et al. (1995), para purificação e aumento do número de rizobactérias, e mantidos por 7 dias a  $28^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 7-** Transferência das rizobactérias do meio semi-sólido para o meio sólido (a); Meio sólido NFB após 7 dias sob incubação (B).

#### 4.3- Caracterização fenotípica dos isolados de rizobactérias obtidos nas rizosferas

A caracterização fenotípica cultural dos isolados de rizobactérias foi feita com base em Melloni et al. (2004). Os isolados foram transferidos dos meios sólidos para isolamento em meio potato dextrose, em triplicata, e caracterizados com relação ao diâmetro, cor e consistência das colônias (Tabela 1), sendo definidos 7 cores, 5 tamanhos de diâmetros e 4 tipos de consistência. Para comparação com os isolados obtidos das rizosferas, as estirpes-tipo *Azospirillum lipoferum* (BR11080<sup>T</sup>), *Azospirillum brasilense* (BR11001<sup>T</sup>), *Azospirillum amazonense* (BR11040<sup>T</sup>), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175<sup>T</sup>) e *Burkholderia brasilensis* (BR11340<sup>T</sup>) também foram caracterizadas fenotipicamente em meio potato dextrose (Figura 8).

**Tabela 1-** Características fenotípicas das rizobactérias avaliadas e seus respectivos números utilizados no dendrograma de similaridade

COR	DIÂMETRO	CONSISTÊNCIA
Amarelo	<1	Seca
Amarelo cintilante	1,1 – 3	Pegajosa
Branco	3,1 – 5	Aquosa
Branco cintilante	5,1 – 7	Rugosa
Centro amarelo borda branca	>7,1	
Centro branco borda amarela		
Centro branco borda transparente		



**Figura 8-** Isolados em meio potato dextrose para serem caracterizados com o auxílio de um microscópio digital.

Com a utilização do método *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), os isolados e estirpes-tipo caracterizados foram agrupados em dendrogramas de similaridade, utilizando o programa STATISTICA 10 (STATISTICA, 2010). Por meio da variação dos aspectos culturais apresentados pelos isolados, determinou-se a diversidade fenotípica-cultural de cada cultivar, conforme Shannon-Weaver (MAGURRAN, 1987).

Os dados obtidos por meio do cálculo de Shannon-Weaver foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk onde se apresentaram não normais, utilizando-se a transformação dos dados raiz quadrada de  $x + 1$ . Posteriormente, os dados transformados foram submetidos ao teste de comparação de médias Scott- Knott, pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008). Ao final da caracterização, os isolados e estirpes-tipo foram

mantidos em meio inclinado JNFb, Nfb e LGI para quantificação da produção de AIA e armazenamento (Figura 9).

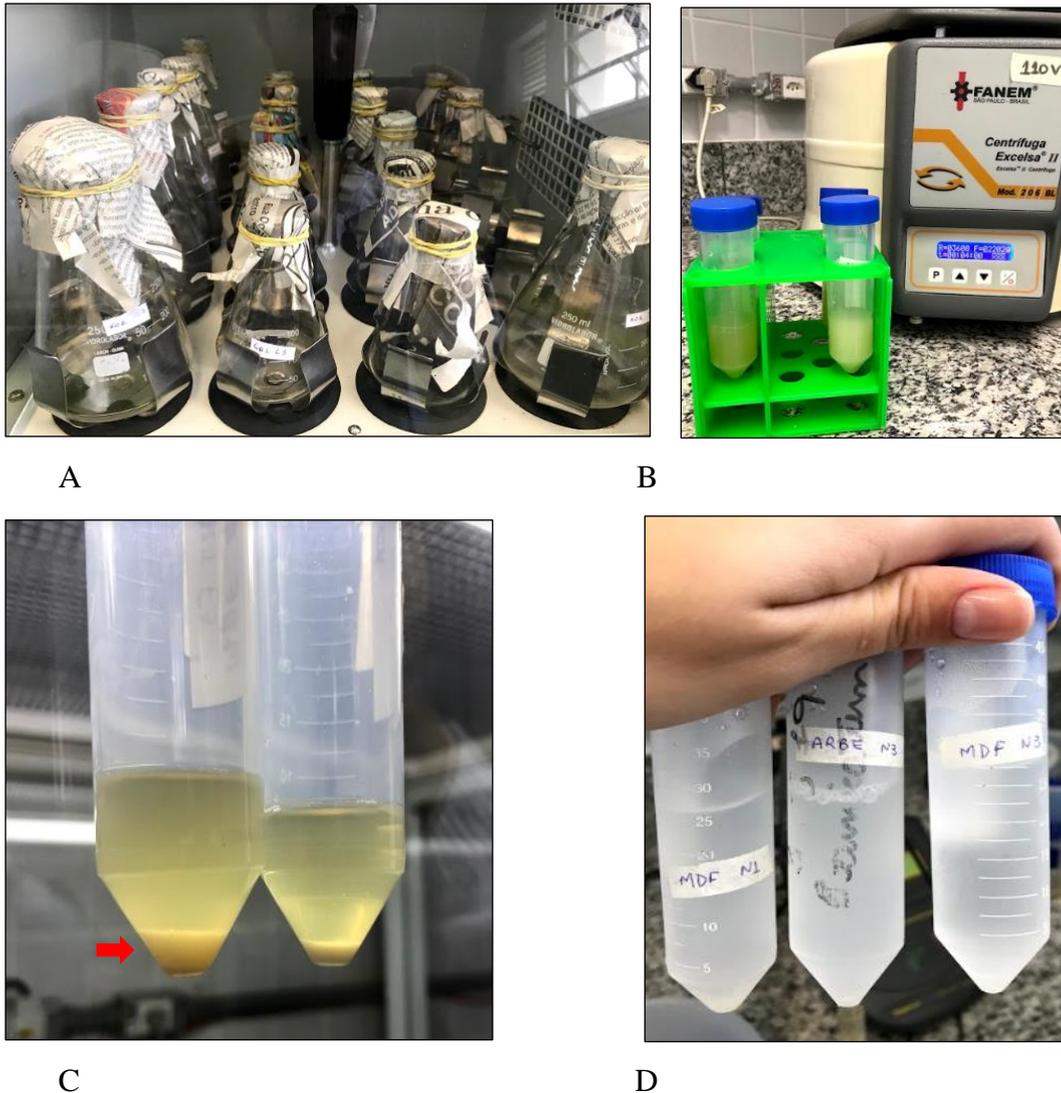


**Figura 9-** Meios de cultura inclinados inoculados com rizobactérias para utilização na etapa de quantificação de AIA e armazenamento.

#### 4.4- Quantificação da produção de AIA pelos isolados

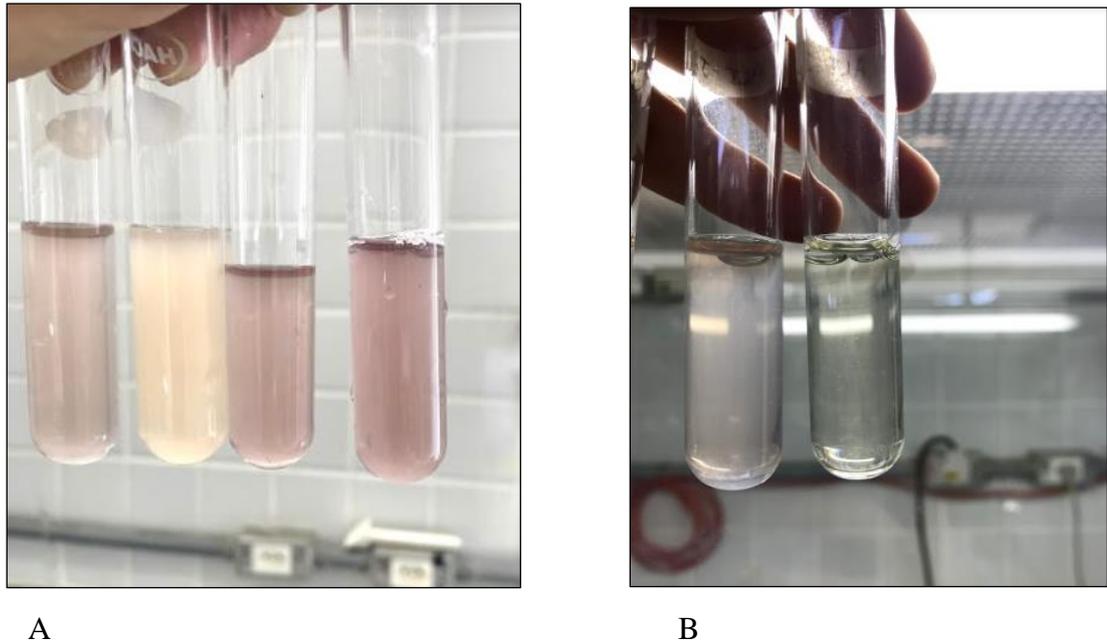
A quantificação da produção de AIA pelos isolados de rizobactérias foi realizada com base na metodologia de Kuss et al. (2007). Os isolados mantidos no meio inclinado foram transferidos para erlenmeyers contendo 10 mL de meio líquido Dygs (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986). Optou-se pela não adição de triptofano, conforme sugestão de Yamada et al. (2003), pelo fato do meio de cultura já possuir extrato de levedura, considerado uma fonte rica de aminoácidos, inclusive de triptofano.

Em seguida, foram submetidos à agitação por 72 horas em temperatura ambiente, para atingir fase logarítmica (NÓBREGA et al., 2004) até que o meio ficasse turvo. Após esse período, foram transferidos para tubos e centrifugados a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de solução salina 0,85% foram adicionados ao precipitado de células. Com a utilização do espectrofotômetro (PerkinElmer, UV/VIS Spectrometer, Lambda 25) a 600 nm, as suspensões foram ajustadas para densidade ótica (DO) 0,5 (utilizando os valores de absorbância), acrescentando alíquotas de solução salina até obter DO=0,5, utilizando para leitura como branco a própria solução salina (Figura 10).



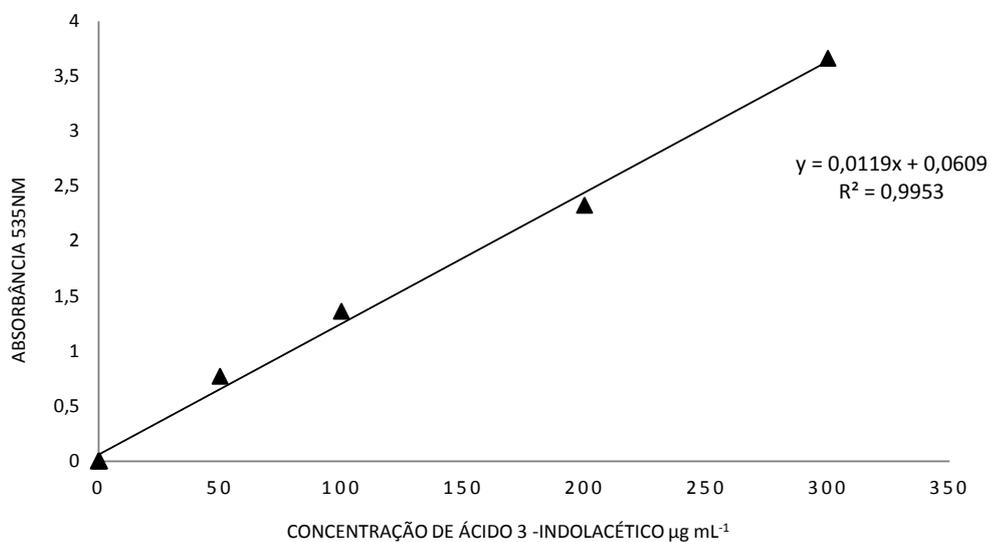
**Figura 10-** Meio líquido Dygs inoculado sob agitação para crescimento das rizobactérias (A); Tubos com 20 mL das suspensões para primeira centrifugação (B); Tubos após centrifugação antes do descarte do sobrenadante, com o precipitado de células (indicado pela seta) para ajuste da DO (C); Suspensões após ajuste da DO para 0,5 com solução salina 0,85% (D).

Após ajuste da DO, 0,500 mL da suspensão com os isolados foram colocados em 20 mL de meio líquido Dygs e agitados por mais 72 horas a 30 °C. Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas foram novamente transferidos para tubos e centrifugados por 30 min a 3600 rpm, até que ficasse translúcido. Ao fim da centrifugação, foram retirados 3 mL do sobrenadante e adicionados a 2 mL de reagente Salkowski, preparado da seguinte forma: 1 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5M ( $1,35\text{g } 10 \text{ mL}^{-1}$ ), 50 mL de  $\text{HClO}_4$  (35%) (GORDON; WEBER, 1951). Os frascos com a suspensão foram armazenados em ambiente escuro por 30 min para desenvolvimento de cor, onde quanto mais intenso o tom de rosa avermelhado maior a quantidade de ácido indolacético (Figura 11). A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm (SILVA, 2010), utilizando meio líquido Dygs autoclavado, com reagente Salkowski como branco para leitura.



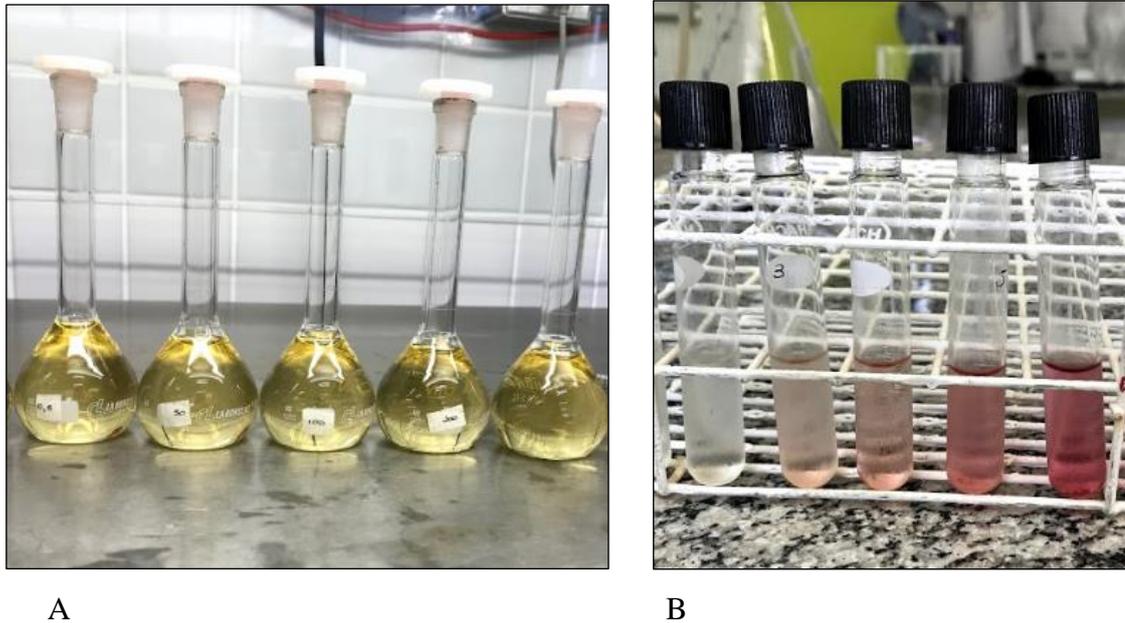
**Figura 11-** Tubos com a suspensão com adição do reagente Salkowski após 30 minutos no escuro para formação de cor (A); Suspensão positiva (direita) e solução usada como branco (esquerda) para medição da concentração de AIA através do espectrofotômetro (B).

A construção da curva-padrão com a concentração dos compostos indólicos (Figura 12) para comparação com a produção dos isolados e estirpes-tipo foi preparada previamente com base na metodologia de Galdiano Júnior (2009), por meio de diluições da solução de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich®), utilizando meio líquido Dygs esterilizado e quantidades conhecidas do hormônio, adicionadas 2 mL de reagente Salkowski para cada 3 mL da diluição.



**Figura 12-** Curva padrão das concentrações de AIA comercial para comparação com a produção dos isolados e estirpes.

Foram cinco concentrações diferentes de AIA comercial (0, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para geração da equação. As diluições também foram mantidas por 30 min em ambiente escuro para formação de cor e a intensidade da cor foi determinada por espectrofotômetro a 535 nm (KUSS et al., 2007) (Figura 13). Os valores de absorbância obtidos foram inseridos na equação obtida na curva padrão para gerar os resultados expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada isolado.



**Figura 13-** Diluições de 0 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para construção da curva padrão (A); Frascos das diluições com reagente Salkowski após 30 minutos no escuro (B).

#### 4.5- Microbiolização e enraizamento das estacas de oliveira

A etapa de microbiolização foi realizada com estacas da cultivar Grappolo 541 devido sua boa resposta à inoculação com microrganismos nos trabalhos realizados por Ferreira et al. (2015), Mariosa et al. (2017), Silva et al. (2017), com a utilização das 4 rizobactérias que apresentaram a maior produção de hormônio AIA (item 4.4). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com sistema de nebulização intermitente, na unidade de produção de mudas de oliveira por estacas enraizadas, da Fazenda Experimental de Maria da Fé/MG, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (FEMF-EPAMIG).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 4x2, sendo 4 isolados de bactérias que apresentaram maior produção de AIA e 2 estacas com e sem microferimentos. Foram quatro repetições para cada um dos tratamentos. Cada unidade experimental foi composta por um copo plástico com capacidade de 700 mL, de coloração transparente, preenchido com 600 g de areia esterilizada, com 10

estacas por copo (Figura 14), totalizando 40 estacas. As estacas utilizadas foram padronizadas e apresentavam 12 cm de comprimento, quatro folhas e quatro entrenós na região apical, conforme proposto por Oliveira et al. (2010b).



**Figura 14**-Estaca com os padrões exigidos para plantio (A); Estacas nos copos prontas para serem colocadas na casa de vegetação (B).

#### **4.5.1- Preparo do substrato para plantio**

Para preparo do substrato, a areia foi peneirada em malha de 2 mm, para retirar impurezas e, em seguida, lavada em baldes com água corrente, até não formar mais espuma (material orgânico) na superfície. Após a lavagem, a areia foi esterilizada em autoclave, a 121 °C por dois dias alternados. Após o preparo, foram colocados 600g em cada copo plástico, estando, assim, prontos para plantio das estacas. Cada copo possuía três furos na base, para que não houvesse acúmulo de água no substrato (Figura 15).



A



B



C



D

**Figura 15-** Areia sendo peneirada em malha de 2mm (A); lavagem da areia para retirar todas impurezas presentes (B); Após lavagem, esterilizadas em autoclaves (C); após autoclavadas colocadas nos copos para plantio (D).

#### 4.5.2- Preparo das suspensões bacterianas

Para microbiolização das estacas, os isolados de rizobactérias escolhidos com base nas maiores produções de AIA (acima de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foram colocados para crescimento com uma alça de plantinha, em frascos contendo 500 mL meio líquido Dygs autoclavado e, posteriormente, agitados por 72 horas, em temperatura ambiente (Figura 16).



A

B

**Figura 16-** Suspensões utilizadas para inoculação das estacas no agitador para crescimento das rizobactérias (A); Meio líquido Dygs controle (esquerda) e inoculado com um dos isolados (direita), após 72 horas sob agitação (B).

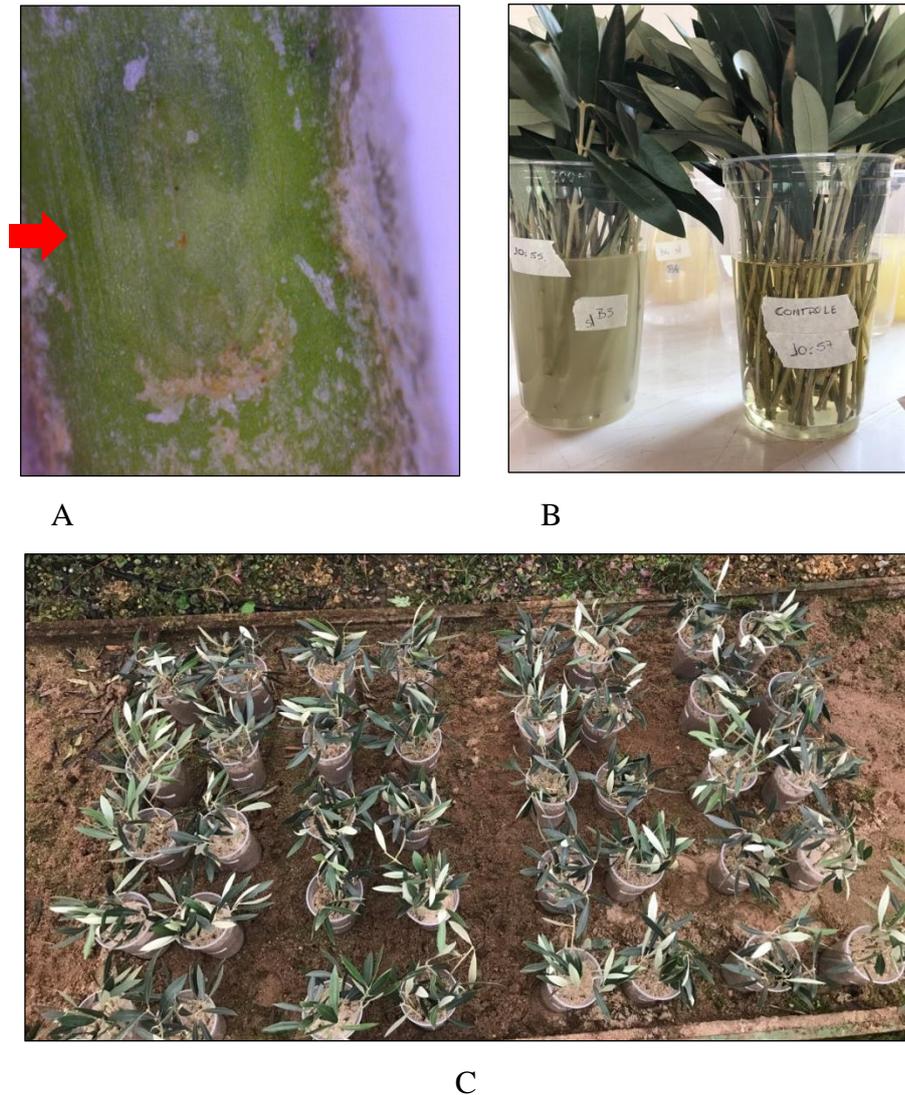
#### 4.5.3- Análise da densidade bacteriana das suspensões utilizadas como inoculante

Foi realizada a análise da densidade bacteriana presente nas suspensões de rizobactérias utilizadas para inocular as estacas, por meio da contagem da quantidade de UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Foram utilizados 0,1 mL, 0,01 mL e 0,001 mL de cada erlenmeyer do tratamento bacteriano e inoculadas em placas de Petri contendo meio Dygs sólido e espalhadas com alça de Drigalsky. O processo foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a 28 °C por três dias.

Após o crescimento, foi realizada a contagem da diluição (acima de 30 e abaixo de 300 colônias), de cada inóculo utilizado. A média obtida foi de  $3,5 \times 10^5$  UFC por mL da suspensão de cada inóculo.

#### 4.5.4- Preparo e plantio das estacas

As estacas utilizadas nesse estudo foram coletadas no mesmo dia da montagem do experimento, em setembro de 2018. Foram cortadas conforme Oliveira et al. (2010b) e realizados ou não os microferimentos (apenas em estacas conforme o tratamento) com uma palha de aço, por 3 vezes em cada uma das estacas, de forma a apresentar ranhuras. Em seguida, as estacas foram colocadas nas suspensões bacterianas por 60 min, com base na metodologia de Baldotto et al. (2010) e inseridas nos copos com substrato devidamente identificados (Figura 17).



**Figura 17-** Estaca após realizar o microferimento com palha de aço com as estrias evidenciadas pela seta, imagem obtida com microscópio digital (aumento de 200x) (A); Estacas imersas na suspensão bacteriana e controle (B); Vasos com as estacas em casa de vegetação após os 60 minutos de imersão nas suspensões, vasos foram dispostos de forma aleatória (C).

#### 4.5.5- Análise dos resultados obtidos

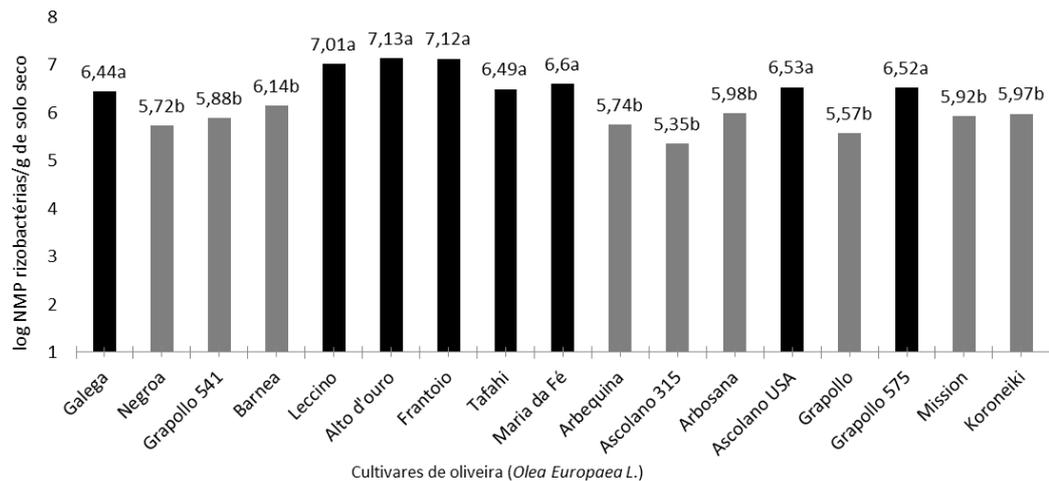
Após o plantio das estacas, o experimento foi conduzido por um período de 70 dias. Ao final desse período, as estacas foram retiradas dos vasos e avaliadas conforme as seguintes variáveis: porcentagem de estacas mortas; estacas com calo e estacas com calo enraizadas; porcentagem de estacas vivas sem alterações. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar sua normalidade. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias Scott-Knott a 0,5% de significância, pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008), verificando a interação entre os fatores microferimentos e rizobactérias.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho estão sendo apresentados seguindo a ordem descrita na metodologia.

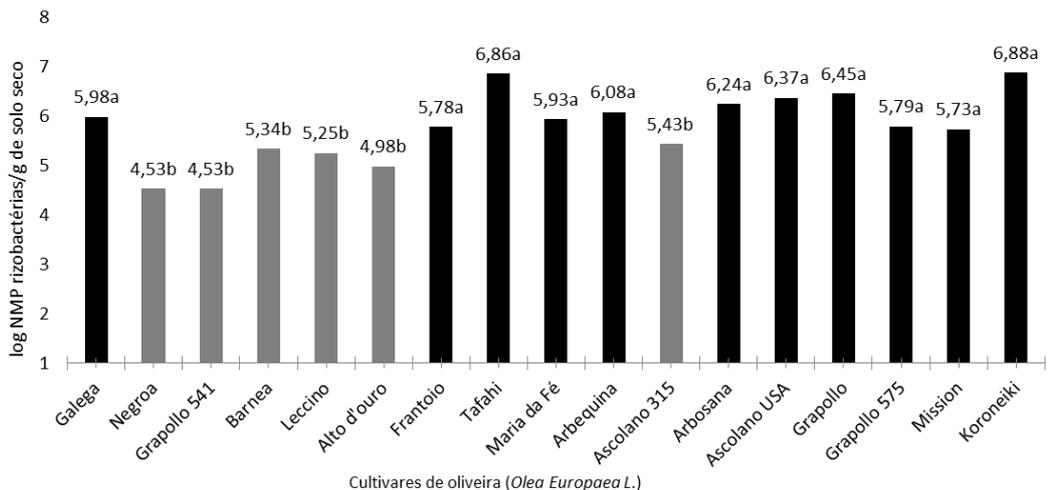
### 5.1- Resultados do isolamento e caracterização dos isolados de bactérias

Após avaliação da formação de película nos meios semi-sólidos JNFb, NFB e LGI, foram obtidos os dados do NMP, apresentados nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente.



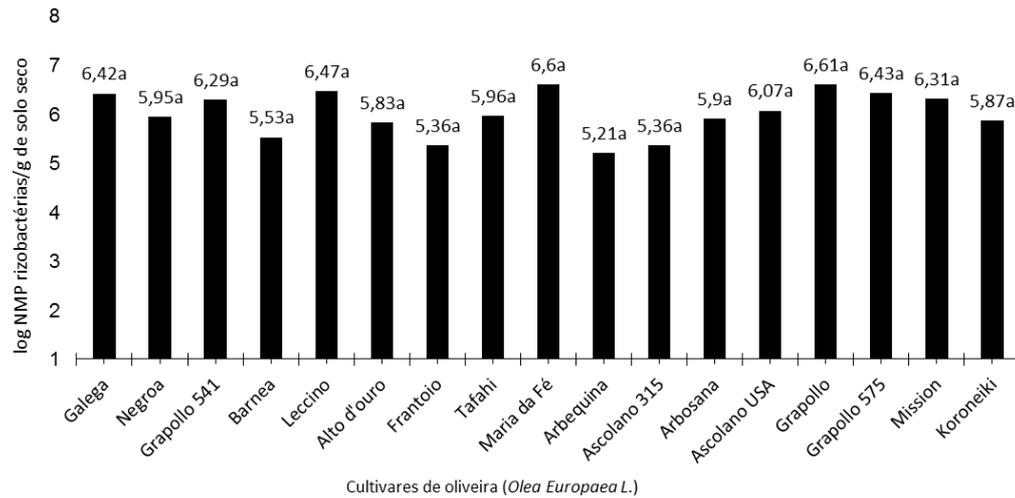
**Figura 18** - Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura JNFb.

Coefficiente de variação: 7,69%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 19** - Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura NFB.

Coefficiente de variação: 11,66%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 20**-Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura LGI.

Coefficiente de variação: 15,14%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Houve efeito das cultivares no número de isolados somente para os meios de cultura JNFb (Figura 18) e NFb (Figura 19). Isso pode ser explicado, principalmente, pelo fato do meio de cultura LGI ser mais específico e indicado apenas para isolamento e quantificação de rizobactérias da espécie *A. amazonense*, diferentemente dos demais meios que podem permitir a quantificação de outras espécies ao mesmo tempo.

Baldani et al. (1999) enfatizaram a falta de especificidade do meio JNFb pelo fato desse meio permitir o crescimento de outras bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum*. Da mesma forma, Magalhães e Döbereiner (1984) mostraram que, mesmo sendo as espécies de *Azospirillum* favorecidas em meio NFb, outros microrganismos diazotróficos também podem crescer nestes meios, o que pode justificar o ocorrido no presente estudo, ou seja, maior probabilidade de isolamento de outras bactérias.

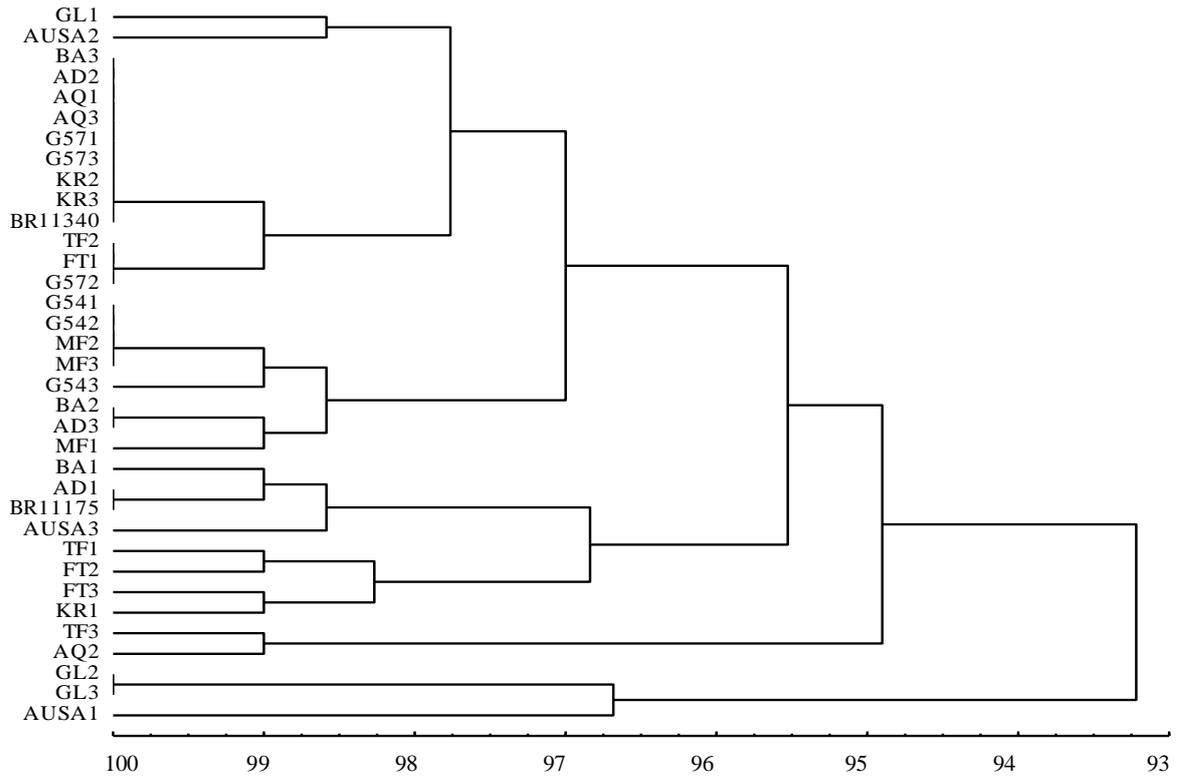
No meio JNFb, as médias obtidas variaram de log NMP 5,35 a 7,13 g<sup>-1</sup> de solo, enquanto no meio NFb a variação foi de 4,53 a 6,88 e, no meio LGI, de 5,21 a 6,61. Com isso, é possível observar que o meio JNFb apresentou os maiores valores. Pôde-se notar, também, a variação da quantidade de rizobactérias por grama de solo seco encontradas em uma mesma cultivar de acordo com o meio de cultura como, por exemplo, a cultivar Leccino onde apresentou no meio JNFb (Figura 18) 7,01 g<sup>-1</sup> de solo, 5,25 g<sup>-1</sup> de solo no meio NFb (Figura 19) e, 6,47 g<sup>-1</sup> de solo no meio LGI (Figura 20). Essa diferença significativa observada entre as diferentes cultivares pode ser explicada pela presença de exsudatos radiculares que podem atrair os microrganismos para a região rizosférica (VALÉ et al., 2005).

Após a avaliação e cálculo da quantidade de bactérias por grama de solo, foi feito o isolamento das rizobactérias, obtendo-se um total de 140 isolados nas amostras de rizosfera das cultivares (Quadro 2). Ao longo das análises das rizosferas das 17 cultivares escolhidas para estudo, em 11 delas foi possível isolar as rizobactérias em todos os meios de cultura. Com isso, seis cultivares foram descartadas em virtude da perda de isolados em alguns meios específicos. Dessa forma, foram utilizados 99 do total de isolados obtidos para realizar as etapas seguintes do trabalho, sendo 33 isolados obtidos em cada um dos meios de cultura, os quais foram realizados em triplicata. As cultivares mantidas e descartadas no estudo estão apresentadas no Quadro 3.

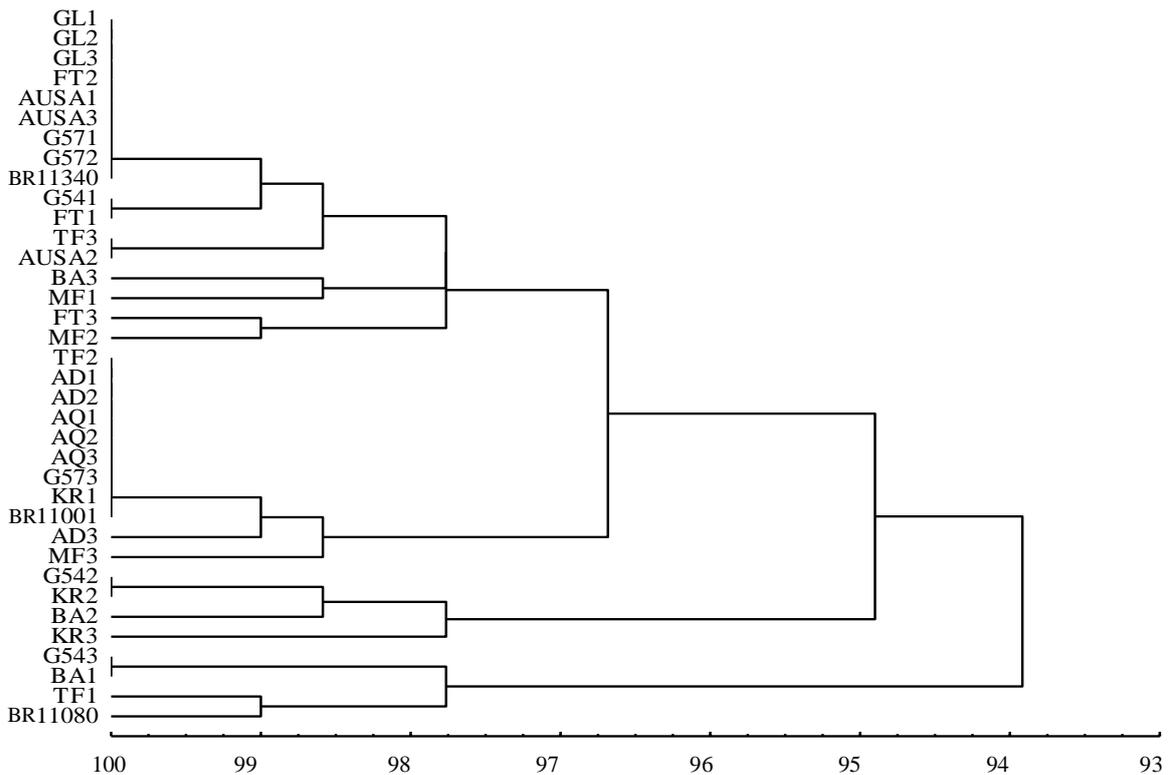
**Quadro 3- Lista das cultivares mantidas e descartadas em estudo e cultivares com seus respectivos códigos utilizados no estudo.**

CULTIVARES MANTIDAS	CÓDIGOS	CULTIVARES DESCARTADAS	CÓDIGOS
ALTO D'ORO	ALT	ARBOSANA	ARBO
ARBEQUINA	ARBE	ASCOLANA 315	ASC 315
ASCOLANA USA	ASC USA	LECCINO	LECC
BARNEA	BAR	GRAPPOLO	GRA
FRANTOIO	FRA	MISSION	MISS
GALEGA	GAL	NEGROA	NEG
GRAPPOLO 541	GRA 541		
GRAPPOLO 575	GRA 575		
KORONEIKI	KOR		
MARIA DA FÉ	MDF		
TAFAHI	TAF		

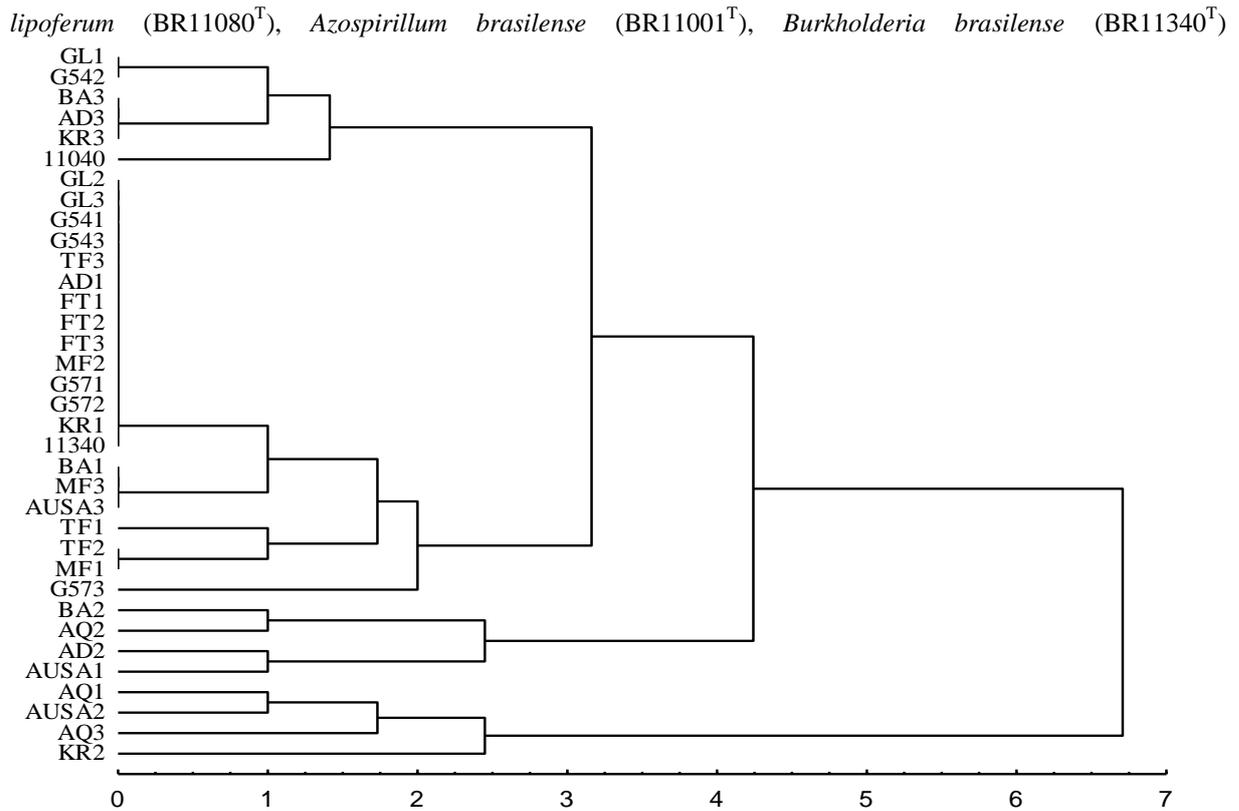
Os dendrogramas de similaridade resultantes da análise de agrupamento dos isolados, conforme cor, diâmetro e consistência das colônias em meios de cultura sólido (Tabela 1), estão apresentados nas figuras 21, 22 e 23, para JNFb, NFb e LGI, respectivamente.



**Figura 21-** Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio JNFb. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Burkholderia brasilense* (BR11340<sup>T</sup>), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11075<sup>T</sup>).



**Figura 22-** Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio NFb. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Azospirillum*



**Figura 23-** Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro das colônias, em meio LGI. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Azospirillum amazonense* (BR11040<sup>T</sup>), *Burkholderia brasilense* (BR11340<sup>T</sup>).

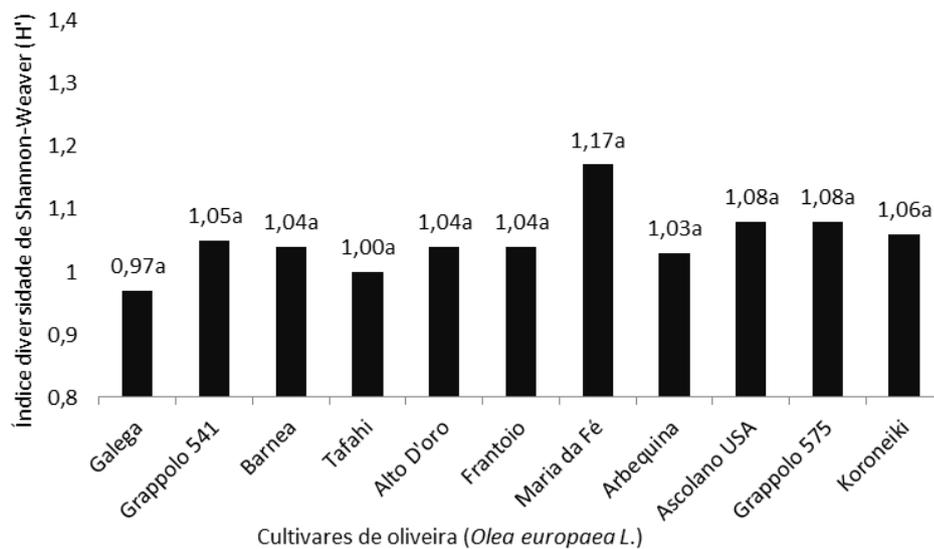
De maneira geral, observou-se alta homogeneidade fenotípica-cultural, independentemente do meio de cultura utilizado, com similaridade de 93 a 100%. Porém, mesmo com a alta similaridade, os critérios utilizados para caracterização foram suficientes para diferenciação entres os isolados obtidos nos respectivos meios de cultura, importante para os ensaios posteriores de quantificação de AIA por grupo. As características que mais foram observadas nos isolados nos diferentes meios foram consistência pegajosa, coloração branca e diâmetros de 1 a 3 mm.

A estirpe-tipo de *Burkholderia* sp. também foi caracterizada e utilizada para a análise de agrupamento, pois, em estudos como de Albuquerque (2016) e Baldani (1996) esse gênero apresentou crescimento nos mesmos meios de cultura que foram utilizados nesse estudo e, como é possível analisar, alguns isolados apresentaram alta semelhança no agrupamento.

Melloni et al. (2004), avaliando a densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação, apresentaram resultados em que o maior número de isolados foi obtido com a utilização do meio JNFb, porém, a análise de similaridade indicou que estes não apresentavam maior similaridade à *Herbaspirillum*. No caso dos dados obtidos no presente estudo, também foram encontradas as

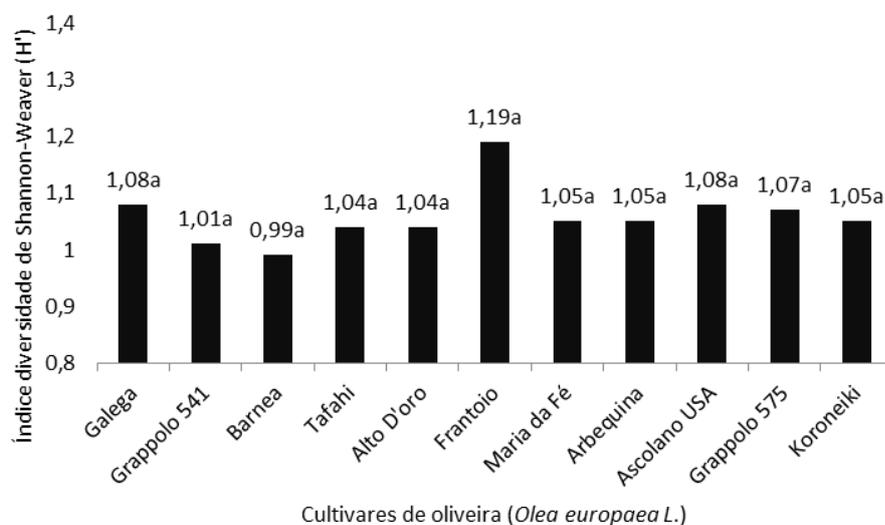
maiores médias de densidade bacteriana no meio JNFb e, na análise de similaridade, mesmo com a alta similaridade, nem todos foram iguais à estirpe tipo *Herbaspirillum seropedicae*.

Essa alta similaridade observada entre os isolados refletiu em uma baixa variação do índice de diversidade de Shannon-Weaver nos meios de cultura JNFb, NFb e LGI (Figuras 24, 25 e 26) entre os isolados apresentando valores não significativos pelo teste de comparação de médias Scott- Knott.



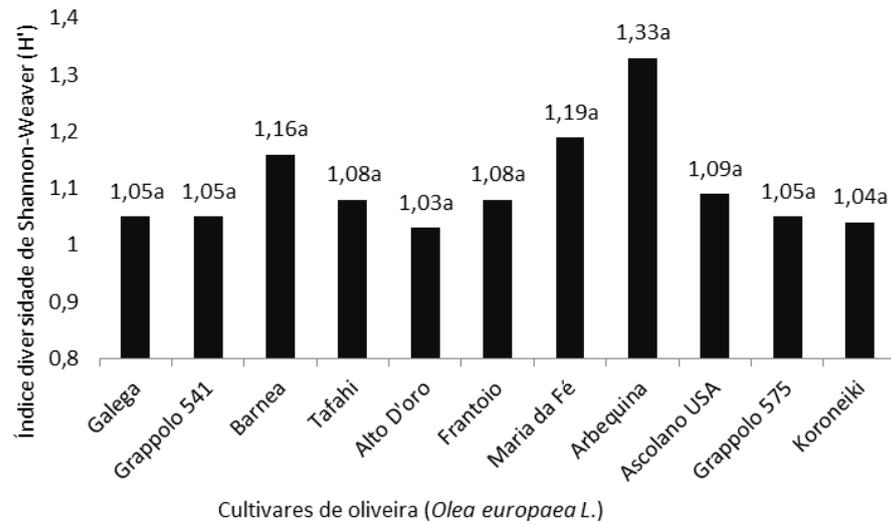
**Figura 24-** Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura JNFb.

Coefficiente de variação: 7,61 %. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 25-** Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura NFb.

Coefficiente de variação: 6,83 %. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 26-** Índice de diversidade de Shannon-Weaver dos isolados de rizobactérias encontrados nas cultivares em meio de cultura LGI. Coeficiente de variação: 17,54 %. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

As Figuras 24, 25 e 26 mostram a média de diversidade fenotípica cultural dos isolados obtidos em cada uma das cultivares. Os índices obtidos no presente trabalho podem ser considerados baixos em todos os meios de cultura, quando comparam-se, por exemplo, aos dados obtidos por Neiverth (2012) que, avaliando a diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo, obteve índices que variaram de 1,688 a 3,006. O índice de Shannon-Weaver é um índice geral de diversidade relacionado à riqueza e abundância de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998). A utilização desse índice permite calcular o grau de incerteza ao prever a que espécie pertence um indivíduo escolhido ao acaso de uma amostra com  $S$  espécies e  $N$  indivíduos. Quanto menor o valor desse índice, menor será o grau de incerteza, com isso, a diversidade da amostra é baixa e, quanto maior o valor do índice, maior tende a ser a diversidade (URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005).

Conforme previamente discutido para a alta similaridade dos isolados em função de seus aspectos morfoculturais, a baixa diversidade aqui apresentada pode estar relacionada à utilização de apenas 3 características dos isolados nos referidos meios de cultura (Tabela 2). Sugere-se que, em novos estudos, outros aspectos sejam abordados, como os bioquímicos e genéticos, de forma a agrupar os isolados com maior grau de distinção.

## 5.2- Resultados da quantificação da produção de AIA dos isolados

Os dados da quantificação de AIA produzida pelos 99 isolados provenientes das 11 cultivares e estirpes-tipo estão apresentados nas Figuras 27, 28 e 29, em ordem decrescente, para os meios JNFb, NFb e LGI, respectivamente. Os dados da produção estão expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e foram separados a partir dos meios de culturas pelos quais cada isolado foi obtido. De todos os 99 analisados, 14 apresentaram turbidez no sobrenadante ao qual o reagente Salkowski foi adicionado e 13 ficaram fora da curva padrão e não foram considerados na etapa de microbiolização das estacas e nem para discussão dos resultados (Quadro 4). Sendo assim, foram mantidos 72 isolados no estudo e, aqueles que apresentaram produção de AIA acima de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (os quais totalizaram 11 isolados), foram separados para seleção para etapa de inoculação das estacas de oliveira.

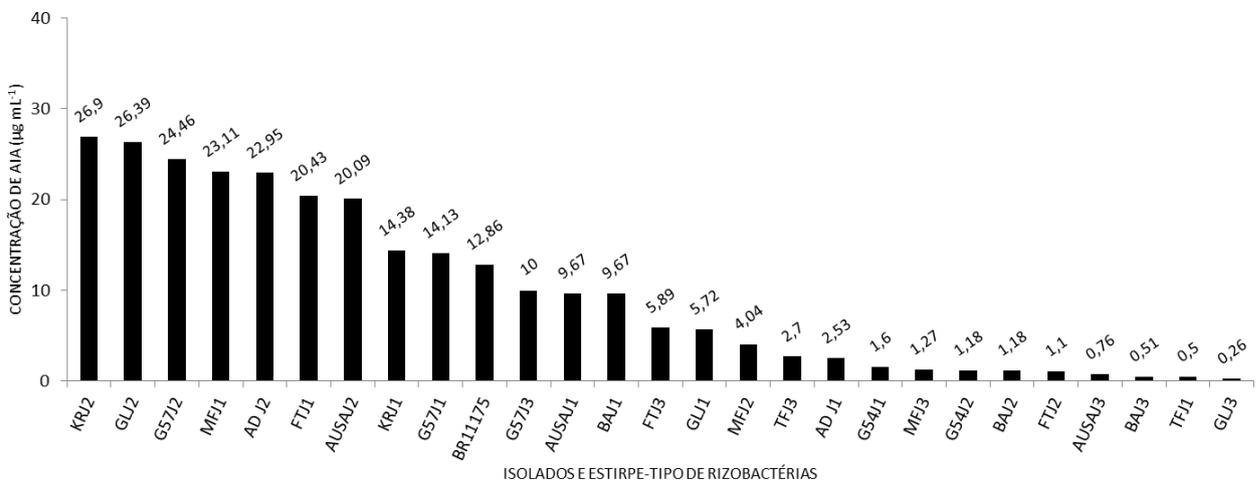
**Quadro 4-** Isolados de rizobactérias descartados do estudo por apresentarem turbidez e ficaram fora da curva padrão com suas respectivas concentrações de AIA obtidas.

Turvas	Concentração de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fora da curva padrão	Concentração de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
KRJ3	52,02	ADJ3	-1,67
KRL2	37,4	ADL1	-0,91
GLL1	94,97	KRL1	-0,83
ADL3	54,8	GLN3	-2,76
AQJ1	47,40	GLL3	-1,59
AQJ2	108,41	AQJ3	-1,5
AQL1	43,28	AQN1	-6,13
AQL2	88,16	BAN3	-5,12
AQL3	72,02	TFJ2	-016
BAL1	37,57	TFN2	-0,66
G54J3	11,86	TFL2	-0,49
G54L2	58	MFN1	-6,21
FTL2	74,29	MFN3	-0,15
MFL3	41,7		

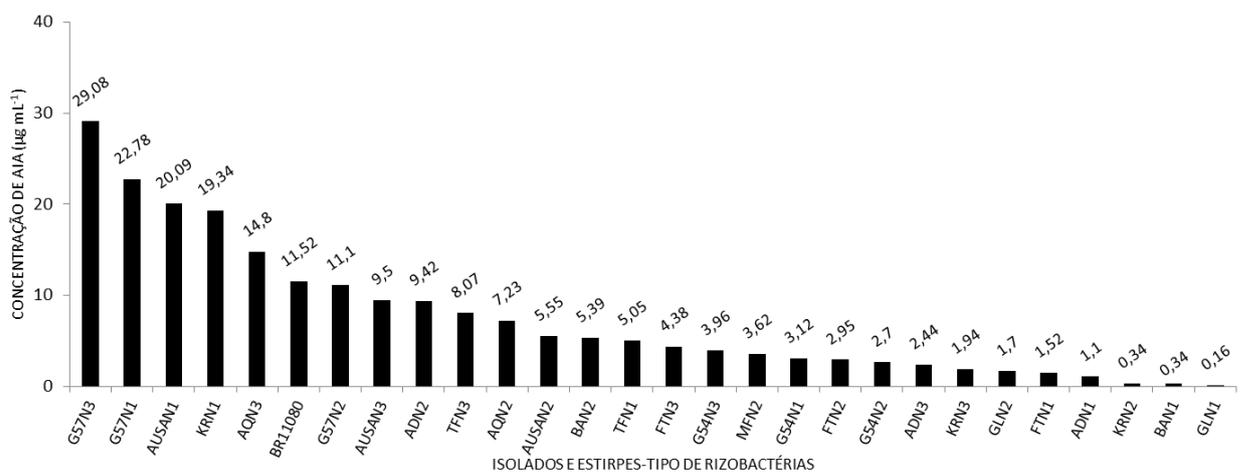
O motivo de alguns isolados apresentarem essa turbidez não foi explicado, pois todos isolados foram agitados e centrifugados pelo mesmo período de tempo sem exceção e, não foi encontrado nenhum estudo que cite essa ocorrência. Possivelmente, tais isolados apresentam maior produção de exopolissacarídeos, comprometendo a determinação do AIA. A capacidade de produção de exopolissacarídeos das rizobactérias é considerada uma característica importante de adaptação a diversas condições de estresse ambiental, como solos

salinos, variação de temperatura e estresse hídrico, além de ajudar a fixar nutrientes e minerais disponíveis próximos à bactéria (BARRETO et al., 2011; CORONADO et al. 1996; LIU et al., 2013).

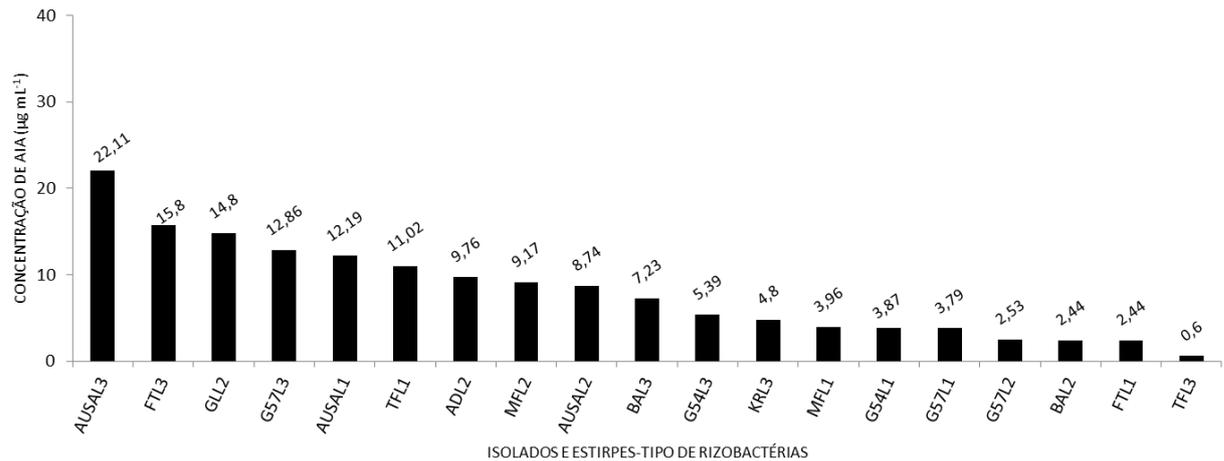
Essa produção é considerada como uma das formas de promoção de crescimento vegetal pelas rizobactérias, onde há a síntese de polissacarídeos e excreção de polímeros solúveis ou insolúveis para fora da célula (SEESURIYACHAN et al., 2012). Foi levado em consideração essa produção pelo fato de que a produção de exopolissacarídeos, também conhecidos como gomas, por formar soluções viscosas e géis em meio aquoso (BARRETO et al., 2011). A maioria dos isolados apresentou consistência pegajosa na fase de caracterização, podendo ter ocorrido durante o seu crescimento no meio líquido Dygs, causando turbidez e interferindo na leitura.



**Figura 27-** Concentração de AIA produzido, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura JNFb.



**Figura 28-** Concentração de AIA produzido, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura NFb.



**Figura 29**-Concentração de AIA produzido, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura LGI.

A concentração de AIA produzido pelos isolados de rizobactérias variaram de 0,16 a 29,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alguns isolados obtidos no meio JNFb (Figura 27) apresentaram uma maior concentração de AIA quando comparados com os obtidos nos meios NFb e LGI (Figuras 28 e 29). Essas concentrações obtidas por parte de alguns isolados podem ser consideradas relevantes, já que não foi utilizada, no presente estudo, a adição de triptofano. O triptofano é considerado o precursor de AIA, pois ao adicioná-lo em meios de cultura promove aumento da síntese. No entanto, há outras vias independentes de triptofano (KUSS et al., 2007).

Boa parte dos estudos relacionados à produção de AIA adiciona triptofano ao meio de cultura, porém, como citado anteriormente, existem vias independentes de produção e, em estudos como de Halda-Alija (2003), não houve a adição de triptofano ao meio de cultura e os isolados de rizobactérias produziram AIA. Por essa razão, não se optou pela adição no presente estudo.

Outro exemplo de estudo, onde não houve adição de triptofano, é o de Kuss et al. (2007), com o objetivo de isolar e quantificar bactérias diazotróficas, associadas a raízes de diferentes variedades de arroz irrigado, e avaliar a produção de ácido indolacético e o potencial de FBN destas bactérias. Os autores obtiveram resultados na produção que variou de 2,79 e 13,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O mesmo foi avaliado em Chaves et al. (2015) na ausência de triptofano, sendo que as cinco estirpes estudadas produziram uma média de 6,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ao comparar esses resultados obtidos por esses autores pode-se verificar que são inferiores aos obtidos no presente estudo, sendo assim um indicativo de que, mesmo na ausência do triptofano, ainda houve uma boa produção de AIA pelos isolados.

Nesse sentido, pode-se afirmar que a produção de AIA pelos isolados pode ser considerada satisfatória em estudos de microbiolização já que quando comparadas com

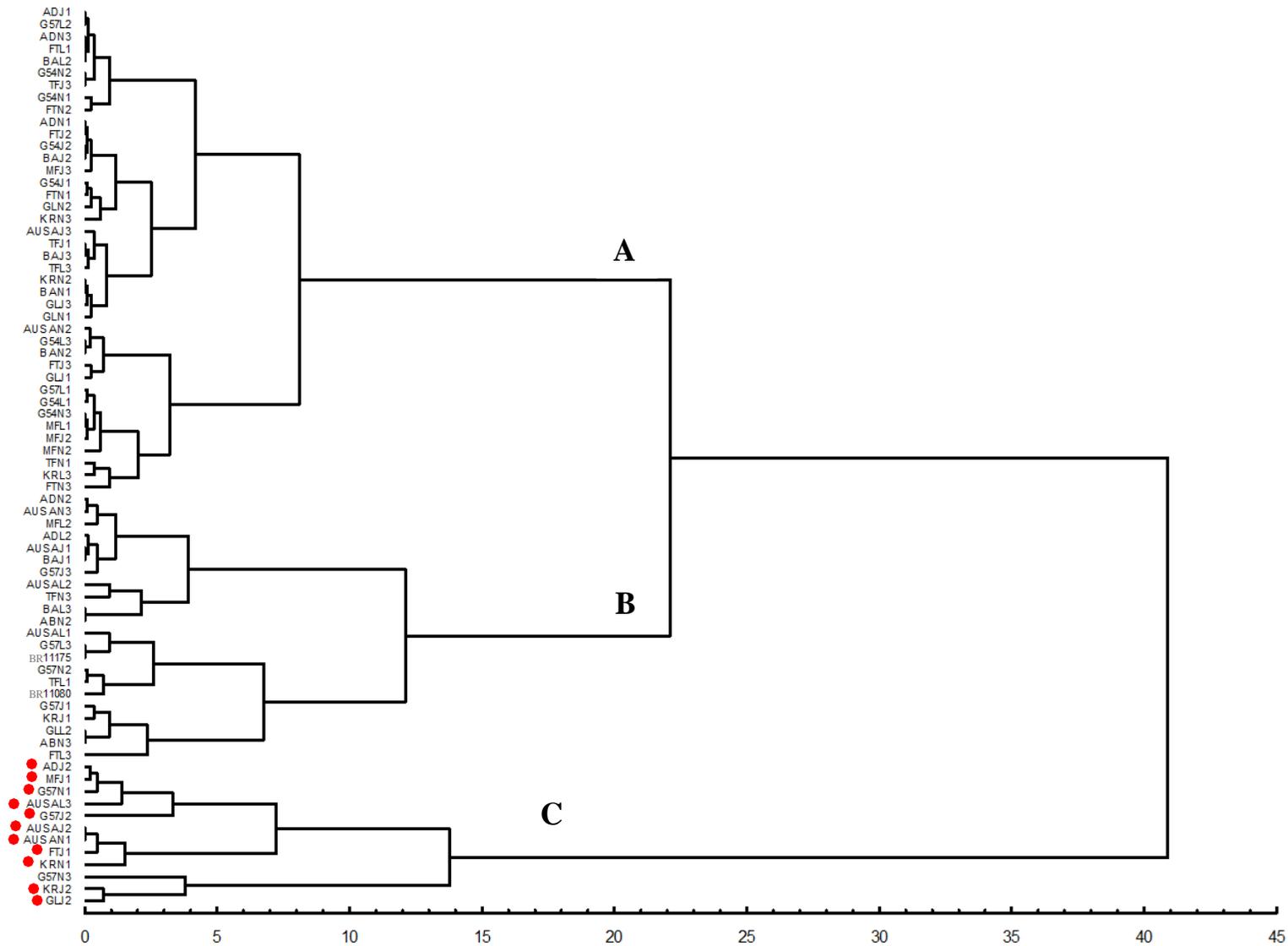
estudos onde realizaram adição do triptofano houve produção semelhante. Exemplo disso em Montero-Calasanz et al. (2013), com objetivo de avaliar a eficiência de enraizamento em estacas de oliveira de Arbequina, Hojiblanca e Picual por inoculação com diferentes bactérias selecionadas com base em suas características fisiológicas como promotoras de crescimento, obtiveram resultados de produção de AIA entre 7,6 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pela rizobactéria *A. brasilense* Cd ATCC 29729.

Florentino et al. (2017), avaliando a produção *in vitro* de AIA por bactérias diazotróficas cultivadas na presença ou ausência do triptofano e o efeito da inoculação destas estirpes em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) observaram que a estirpe UNIFENAS 100-153 foi a que produziu maior quantidade de AIA, independente da presença de triptofano, indicando maior versatilidade metabólica. Os demais isolados apresentaram produção que variaram entre 3,99 a 46,97  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,68 a 37,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nos meios contendo ou não triptofano, respectivamente.

Esses valores de AIA adquiridos tantos nos estudos citados quanto os obtidos no presente estudo estão em conformidade com os obtidos por outros autores, nos quais observaram alta variabilidade na capacidade de produzir este fitohormônio pelas estirpes bacterianas (BALDOTO et al., 2010; CHAVES et al. 2015). Segundo Cassán, Vanderleyden e Spaepen (2014) a produção de AIA pode variar de 5 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em condições de cultivo, de acordo com meio de cultivo e da estirpe testada.

Apesar da presença de triptofano em meio de cultivo promover uma maior síntese de AIA pelas rizobactérias *in vitro*, nem sempre a maior produção irá contribuir para a maior taxa de germinação e desenvolvimento de mudas, como foi o caso do estudo de Florentino et al. (2017) utilizando *Lactuca sativa* L.

A fim de completar a análise dos resultados obtidos na etapa de produção de AIA, foi realizada uma análise de agrupamento com os 72 isolados e 2 estirpes, com base na produção de cada um, na qual gerou o dendrograma de dissimilaridade a seguir (Figura 30) permitindo observar que os maiores produtores estão no mesmo grupo. Os isolados que se encontram no grupo A são os que apresentaram menor produção enquanto no grupo C encontram-se os maiores produtores.



**Figura 30-** Dendrograma de dissimilaridade (%) da produção de AIA pelos isolados obtidos nas rizosfera de oliveira em todos os meios de cultura (11 maiores produtores estão indicados com um ponto vermelho).

No Quadro 5 encontra-se a lista dos 11 isolados citados anteriormente e a concentração obtida em cada um deles com produção  $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Desses isolados foram selecionados os maiores produtores que ainda estavam viáveis: KRJ2, AUSAL3, GLJ2 e MFJ1, para fase de microbiolização das estacas da cultivar Grappolo 541.

**Quadro 5-** Lista dos 11 isolados com produção  $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e suas respectivas concentrações de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Lista das maiores produtoras escolhidas (produção $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
KRJ2	26,90
GLJ2	26,39
G57J2*	24,46
MFJ1	23,11
ADJ2*	22,95
G57N1*	22,78
AUSAL3	22,11
FTJ1	20,43
AUSAN1	20,09
AUSAJ2	20,09
KRN1	19,34

Os isolados assinalados com \* estavam inviáveis para a utilização.

### 5.3- Resultados da microbiolização das estacas com os isolados de rizobactérias

Após 70 dias do plantio das estacas inoculadas com os isolados selecionados, apenas alguns tratamentos mostraram efeito significativo no enraizamento ou porcentagem de estacas mortas (Tabela 2). Não houve efeito significativo estatisticamente para porcentagem de estacas com calos, nem estacas vivas sem alterações.

No geral, observou-se baixa resposta da cultivar Grappolo 541 aos isolados, inoculados com ou sem fermento. No entanto, pela Tabela 2 é possível observar que apenas os tratamentos nas estacas sem fermentos, inoculadas com as rizobactérias KRJ2 e GLJ2, apresentaram efeito significativo na porcentagem de estacas mortas. Para porcentagem de estacas enraizadas houve diferença significativa para os tratamentos nas estacas sem fermentos inoculadas com as rizobactérias GLJ2 e AUSAL3. Porém, mesmo com efeito significativo, apresentaram porcentagem muito baixa quando comparadas a outros estudos com a utilização do AIB em oliveira: até 44% em Silva et al. (2012c), 71,75% em Cappellaro et al. (2013) e, até mesmo com inoculação de rizobactérias: trabalho de Mariosa et al. (2017), onde as estacas inoculadas dessa mesma cultivar apresentou porcentagem de enraizamento de

até 35%. Detalhe do enraizamento de estacas de alguns tratamentos pode ser visto na Figura 31.

**Tabela 2-** Efeito dos tratamentos sem ferimentos e com ferimentos, respectivamente nas variáveis: Estacas enraizadas; Estacas mortas; Estacas com calo e Estacas vivas.

ISOLADOS	Estacas enraizadas (%)		Estacas mortas (%)	
	Sem ferimentos	Com ferimentos	Sem ferimentos	Com ferimentos
<b>KRJ2</b>	0 Ba	0 Aa	3,75 Aa	1,25 Ab
<b>GLJ2</b>	0,75 Aa	0,25 Ab	4,25 Aa	3,0 Aa
<b>AUSAL3</b>	0,75 Aa	0 Ab	1,5 Bb	3,25 Aa
<b>MFJ1</b>	0 Ba	0 Aa	0,75 Ba	2,0 Aa

	Estacas com calo (%)		Estacas vivas sem alterações (%)	
	Sem ferimentos	Com ferimentos	Sem ferimentos	Com ferimentos
<b>KRJ2</b>	0,5 Aa	1,75 Aa	5,5 Aa	6,75 Aa
<b>GLJ2</b>	0,75 Aa	1,5 Aa	4,25 Aa	5,5 Aa
<b>AUSAL3</b>	2,5 Aa	2,5 Aa	5,25 Aa	4,25 Aa
<b>MFJ1</b>	2,5 Aa	2,5 Aa	6,25 Aa	5,5 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Coefficiente de variação: Estacas enraizadas 192,37%. Estacas mortas 45,85%. Estacas com calo 90,10%. Estacas vivas sem alterações 37,14%.



**Figura 31-** Estacas de alguns dos diferentes tratamentos que apresentaram enraizamento positivo após 70 dias de plantio (nas laterais estão as estacas inoculadas com rizobactérias diferentes).

As baixas porcentagens obtidas no enraizamento podem ser justificadas pela época da condução do experimento, já que em diversos estudos têm-se observado influência da época de coleta das estacas no enraizamento. Silva et al. (2012c) explicam que, com o fim da fase produtiva da oliveira, que acontece dentro do período entre fevereiro e março, elas retornam seu crescimento e produção a partir daí, favorecendo o processo de enraizamento por possuir uma reserva maior de substâncias. Em agosto, as plantas passam a reduzir seu metabolismo e substâncias de reserva, podendo comprometer o processo de formação de raízes. Cabe lembrar que o presente experimento foi conduzido em setembro de 2018, época considerada inadequada para o enraizamento Oliveira et al. (2010c). O experimento foi instalado nessa época em função dos isolados terem sido caracterizados (aspectos morfológicos e produção de AIA) e viáveis somente nesse período. Sugere-se que novos estudos, agora com os isolados armazenados, sejam conduzidos em abril, considerado a melhor época para o enraizamento (OLIVEIRA et al.,2003).

A cultivar Grappolo 541, a mesma utilizada nesse trabalho, quando avaliada por Silva et al. (2012c), em abril, as estacas apresentaram 12% de enraizamento para 7% em agosto e, para formação de calos de 56% em abril para 52% em agosto. Sendo assim, a baixa eficiência na formação de raízes adventícias observada no presente experimento pode ser influenciada pela época de coleta e estaqueamento, tornando-se um fator importante sua realização no período ideal.

Conhecendo-se as características fenológicas das oliveiras permite-se um melhor enraizamento, pois determinadas fases do ciclo de vida da cultivar influenciará o enraizamento. Cada cultivar pode atuar de forma diferente em determinadas épocas de coleta de estacas para enraizamento. Um exemplo em Silva et al. (2012c) foram algumas das cultivares estudadas que mostraram maiores porcentagens de enraizamento cada uma em uma época diferente. Esses fatores podem ter comprometido o sucesso dos resultados obtidos no presente trabalho, não apresentando enraizamento favorável nem para as rizobactérias inoculadas.

Entretanto, mesmo com a baixa porcentagem de enraizamento, a porcentagem de estacas mortas foi baixa, destacando-se os tratamentos com as rizobactérias KRJ2 e GLJ2 nas estacas sem ferimentos e, a formação de calo foi avaliada em todos os tratamentos, mas não diferiram no teste estatístico. A formação de calo ocorre caso a espécie ou cultivar apresente dificuldade na emissão de raízes. Ainda, a formação desses calos é relacionada com a formação de raízes, crescimento de células de forma desordenada responsável pela

cicatrização do corte efetuado na base da estaca, conhecido como uma estrutura indicativa de iniciação de formação de raízes adventícias (HAN; ZHANG; SUN, 2009).

Outra hipótese se relaciona à concentração bacteriana do inóculo utilizado. De acordo com Martínez-Viveros et al. (2010), em geral, as suspensões bacterianas de rizobactérias comercializadas são preparadas a densidades de  $10^8 - 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> para imersão de raiz e inoculação do solo e, no presente estudo, foi observada densidade de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Com isso, sugere-se determinar a curva de crescimento desses isolados e a possibilidade de preparar o inóculo utilizando-o no primeiro ou segundo dia de cultivo. Dessa forma, será possível manter sempre a fase de crescimento dessas rizobactérias e um provável aumento na densidade a ser inoculada.

Outra sugestão é o com relação ao preparo do inóculo. Sugere-se que ele seja preparado por meio do método batelada alimentada, sendo uma estratégia onde os nutrientes são adicionados durante o cultivo e os produtos permanecem até o final do cultivo (CHICO et al., 2007, ALMEIDA, 2010). Este método pode apresentar efeitos positivos no crescimento das culturas em relação à densidade celular e ao aumento da biomassa no cultivo, quando comparado com o método de batelada simples (CHEN; ZHANG, 1997).

## **6- CONCLUSÃO**

As cultivares de oliveira influenciam, diferentemente, o número de isolados e as diferenças na caracterização fenotípica observada, apesar da alta similaridade entre si.

Os isolados apresentam produção satisfatória de AIA, quando comparada com outros estudos, mesmo na ausência de triptofano, com destaque para isolados do meio JNFb.

Os isolados GLJ2 e AUSAL3 apresentam potencial de atuar positivamente no enraizamento das estacas de oliveira.

Os microferimentos nas estacas, durante o processo de microbiolização, não promovem melhorias no enraizamento.

## 7- REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A.O.; KLOEPPER, J.W. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1–12, 2009.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiology Research**, Amsterdam, v.163, p.173-181, 2008.
- ALBUQUERQUE, S. A. F. **Diversidade genética e funcional de rizobactérias diazotróficas**. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2016.
- ALMEIDA, A. F. **Estratégias de Produção in vitro de Bioinseticida Viral: Influências do Isolado, da Cinética e do Modo de Operação**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. Brasil. 2010. 133f.
- ANDRADE, S. R. M.; GLÓRIA, B. A.; LABATE, M. T. V.; GOMES, D. G.; LABATE, C. A. **Avaliações da infecção de explantes de feijoeiro por *Agrobacterium tumefaciens* por meio de microscopia**. 1. ed. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2001. 15p.
- ANVISA. Resolução RDC nº 207, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo. Brasília. 23 set. 2005.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.2, p.456-462, 2008.
- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/B. elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1633-1643, 1999.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: Fundamentals and applications**. 4 ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998, 694 p.
- BABALOLA, O. O.; OSIR, E. O.; SANNI, A.; ODHAIMBO, G. D.; BULIMO, W. D. Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. **African Journal of Biotechnology**, Sapele, v.2, p.157-160, 2003.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.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, SBCE/UFLA/DCS, p.621-666, 1999.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de inoculação e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma**

**nova bactéria diazotrófica**. 265p. (Tese de Doutorado em Agronomia). - Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSANSMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.349-360, 2010.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; CAMPOS Jr, F. A. S.; SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; GODOY, H. T. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. **Food Research International**, Ottawa, v. 62, n.1, p. 74-83, 2014.

BARRETO, M. C. S.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.

BERNABEU, P. R.; PISTORIO, M.; TORRES-TEJERIZO, G.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.191, p.113-120, 2015.

BEZERRA, G. A.; MACEDO, D. A.; NASCIMENTO, I. O.; SOUSA, T. P.; COSTA, N. B.; SOUSA, L. F. R. A. Uso de Bacillus spp. no controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade BRS Valiosa RR. **Agroecossistemas**, Belém, v. 5, n. 1, p. 68-73, 2013.

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

BUSATO, L. M. **Resistência de porta-enxertos e híbridos de tomateiro à *Ralstonia solanacearum***. 2017. 42p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2017.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. **Revista Latino americana de Microbiología**, Cidade do México, v. 48, n. 2, p. 154-161, 2006.

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

CANELA, M.R.; GONZÁLEZ, M.A.M. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. **Maturitas**, Amsterdam, v.68, n.3, p.245-250, 2011.

CANELLAS, L. P.; SILVA, S. F.; OLK, S. C.; OLIVARES, F. L. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. **Journal of Food Agriculture Environment**, Helsinki, v.13, p.131-138, 2015.

CANÇADO, G. M de A.; BRAGA, F. T.; SOUZA, R. A. V.; NUNES, C. F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. **Cultivo *in vitro* de oliveira e suas aplicações**. Capítulo 10. 2013.

Disponível em:

<[http://www.researchgate.net/profile/Geraldo\\_Cancado/publication/234047087\\_Cultivo\\_in\\_vitro\\_da\\_oliveira\\_e\\_suas\\_aplicacoes/links/09e4150e89a8cea160000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Geraldo_Cancado/publication/234047087_Cultivo_in_vitro_da_oliveira_e_suas_aplicacoes/links/09e4150e89a8cea160000000.pdf)>. Acesso em: 09 maio 2018.

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

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221p.

CASSÁN F.; VANDERLEYDEN J.; SPAEPEN S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plantbacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal Plant Growth Regulation**. New York, v.33, p.59-440, 2014.

CAVALHEIRO, C. V.; ROSSO, V.D.; PAULUS, E.; CICHOSKI, A. J.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; BARIN, J. S. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1874-1879, 2014.

CHAMANGASHT, S.; ARDAKANI, M. R.; KHAVAZI, K.; ABBASZADEH, B.; MAFAKHERI, S. Improving lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and yield by the application of biofertilizers. **Annals of Biological Research**, London, v.3, p.1876–187, 2012.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v.39, p. 1595-1602, 2015.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p.221-224, fev. 1997.

CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. **Biorreatores para células animais**. In: Moraes A. M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. R.. Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica. São Paulo: Roca, 2007. p. 216-254.

CORONADO, C., SÁNCHEZANDDÚJAR, B., PALOMARES, A.J. Rhizobium extracellular structures in the symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.12, p.127-136, 1996.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 1.ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 2009.125p.

COUTINHO, H. L. C.; JORGE, R. O.; HAERTER, J. A.; COSTA, V. B. **Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2015.181p. Disponível em: <<http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00084680.pdf>>. Acesso em: 09 maio 2018.

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

DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, United Kingdom, v. 157, n.3, p. 361-379, 2010.

EL TAWHEEL, A. A.; OMAR, M. N. A.; SHAHEEN, S. A. Effect of inoculation by some plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on production of 'manzanillo' olive trees. **In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ORGANIC MATTER MANAGEMENT AND COMPOST USE IN HORTICULTURE**, 1018. 2014, ISHS. **Anais...ISHS**, 2014, p. 245-254.

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

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York: J. Wiley, 1993.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, p. 178. 1995.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, v.6, p.36-41, 2008.

FERREIRA, G. M. R.; MELLONI, R.; SILVA, L. F. O.; MARTINS, F. B.; GONÇALVES, E. D. Fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas de oliveira (*Olea europaea* L.) cultivadas no sul de minas gerais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 361-366, 2015.

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

FOSSATI, G. **Multiplicação *in vitro* de variedades de oliveira “arbequina” e “maria da fé” em diferentes meios de cultura e fitorreguladores**. 2015. 20p. Universidade Federal de Santa Catarina - Campus de Curitibanos, Curso de Ciências Rurais. Curitibanos, 2015.

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

GHOLAMI, A.; SHAHSAVANI, S.; NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.49, p.19-24, 2009.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, p.699-703, 2003.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 26, n. 1, p 192-195, 1951.

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.

HAN, H.; ZHANG, S.; SUN, X. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.8, p.348-353, 2009.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 542p.

INDICADORES DA AGROPECUÁRIA. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, n.10, 15 de out. 2017. Mensal. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/precos/revista-indicadores-da-agropecuaria/item/download/15184\\_534a7e638e1aaba931605744bab70d80](https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/precos/revista-indicadores-da-agropecuaria/item/download/15184_534a7e638e1aaba931605744bab70d80)>. Acesso em: 09 maio 2018.

INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL (IOC). **Brasil: olive oil imports**. Market Newsletter, 2017. Disponível em: < <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/698-year-2018-news/1092-market-newsletter-april-2018> >. Acesso em: 13 maio. 2018.

JUNGES, E.; BASTOS, B.O.; TOEBE M.; MULLER, J.; PEDROSO, D. C.; MUNIZ, M. F. B. Restrição hídrica e Peliculização na microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma spp*. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v.5, n.1, p.18-25, 2014.

JUNGES, E.; MUNIZ, M. F. B.; BASTOS., B.O; ORUOSKI, P.; MICHELON, C. J. Techniques microbiolization seed forage radish with *Trichoderma spp.* and *Bacillus subtilis*. **Agriária**, Recife, v.12, n.2, p.135-141, 2017.

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

LIU, S.; CHEN, X.; HE, H.; ZHANG, X.; XIE, B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the arctic sea ice bacterium *pseudolateromonas sp.* Strain SM20310. **Applied Environment Microbiology**, v.1. p.224. 2013.

LIVRAMENTO, D. E.; OLIVEIRA, A. F. Ecofisiologia da oliveira, alguns aspectos de fotossíntese, temperatura e radiação solar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 27-32, 2006.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, vol. 38. p. 264-268, 2013.

LUZ, W. C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.597-600, 2001.

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

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

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey: Princeton, 1987. 179p.

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

MARQUES, A. P. G. C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.42, p.1229-1235. 2010.

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

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**, Viçosa, v. 28, p. 85-93, 2004.

MENDES, A. Q. **Resistência à murcha bacteriana em linhagens e híbridos de tomateiro**. 83p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

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

MOTA, W. F.; OLIVEIRA, G. B.; NOBRE, S. AM; SILVA, H. R. Agronomic performance of okra under the effect of seed microbiolization with rhizobacteria. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.35, p.410-414, 2017.

NASCIMENTO, I.O.; RODRIGUES, A. A. C.; BRAUN, H.; SANTOS, C. C.; CATARINO, A. M. Silicon fertilization and seed microbiolization on disease severity and agronomic performance of upland rice. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 1, p. 126-134, 2018.

NATIONAL ORGANIC STANDARDS BOARD (NOSB). **Results from the Spring 2013 meeting of the National Organic Standards Board**. Beyond Pesticides. Disponível em: <<https://www.beyondpesticides.org>> . Acesso em: 15 maio 2018.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.

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

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

OLIVEIRA, A.F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; REGINA, M.A.; RINCÓN, C.D.R. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.117-125, 2003.

OLIVEIRA, A. F.; VIEIRA NETO, J.; GONÇALVES, E. D.; VILLA, F.; SILVA, L. F. O. Parâmetros físico-químicos dos primeiros azeites de oliva brasileiros extraídos em Maria da Fé, Minas Gerais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.3, p.255-261, 2010a.

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

OLIVEIRA, M. C. **Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB**. 2009. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009a.

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, p.99-103, 2010c.

PEYVANDI, M.; FARAHANI, F.; MAZINANI, M. H.; NOORMOHAMADI, Z.; ATAI, S.; ASGHARZADE, A. *Pseudomonas fluorescent* and its ability to promote root formation of olive microshoots. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 4, n. 1, p. 63-66, 2010.

PESTANA-BAUER, V. R.; GOULARTE-DUTRA, F. L.; ZAMBIAZI, R. Caracterização do fruto da oliveira (variedade Carolea) cultivada na região sul do Brasil. **Alimento e nutrição**, Araraquara, v.22, n.1, p.87-79, 2011.

PIO, R.; BASTOS, D.C.; BERTI, A.J.; SCARPARE FILHO, J.A.; MOURÃO FILHO, F.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, v.29, p.562-567, 2005.

RATZ, R. J.; PALACIO, S. M.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; VICENTINO, R. C.; MICHELIM, H. J.; RICHTER, L. M. Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. **Engevista**, Rio de Janeiro, v. 19, n.4, p. 890-905, 2017.

- REIS, V.M.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Ecologia, Isolamento e Identificação de Bactérias Diazotróficas**. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org). *Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta. Ferramentas para uma agricultura sustentável*. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, v. 1, p. 257-280.
- ROCHA, L. A.; VIEIRA, B. S.; MOTA, L. C. B. M.; LOPES, E. A. Potencial de isolados de *bacillus* sp. para o controle de *curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 14, n. 1, p. 45-50, 2016.
- RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; DE OLIVEIRA, A L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, London, v.302, p. 249-261, 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**, Amsterdam, v.17, p.319-339, 1999.
- SANTOS, F. F.; BANDEIRA, J. M.; MARINI, P.; MARTINS, A. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES, D. M. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.
- SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *trichoderma spp.* e ácido indol-3- butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 966-972, nov./ dec, 2010.
- SANTOS, R. D.; LEMOS, R. C; SANTOS, H. G.; KER, J. C.; ANJOS, L. H. C. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 5. ed. revista e ampliada. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência de Solo, 2005.
- SANTOS, T. M. **Germinação e dormência de sementes de passifloráceas e seleção de genótipos resistentes à *fusarium spp.*** 2015. 139p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 2015.
- SCHILIRÒ, E.; FERRARA, M.; NIGRO, F.; MERCADO-BLANCO, J. Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. **Plos One**, San Francisco, v.7, n. 11, p. 1-11, 2012.
- SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid State Fermentation under High Salinity Stress. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v.76, n.5, p. 912-917, 2012.
- SILVA, H. S. A.; VIEIRA, R. S.; CARDOSO, K. G. V.; ARAÚJO, K. S. Processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira por microbiolização com rizobactérias produtoras de ácido indolacético. **Circular Técnica**, Cruz das Almas, v.117, 2016.

SILVA L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ZAMBON, C. R. Caracterização agronômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012b.

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

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012a.

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 em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA, T. F.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P.; GONÇALVES, E. D. Bactérias diazotróficas não simbióticas e enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 61-71, 2017.

SMARSI, R.C.; CHAGAS, E.A.; REIS, L.L.; OLIVEIRA, G.F.; MENDONÇA, V.; TROPALDI, L.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J.A. Concentrações de ácido indolbutírico e tipos de substrato na propagação vegetativa de lichia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, p.7-11, 2008.

STATISTICA. **Statistic Analysis**. Versão 10.0. Cary, 2010.

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

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. – 3. ed. – Brasília, DF : Embrapa, p. 573 2017.

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

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. C. Doenças fúngicas da oliveira: sintomas, etiologia e manejo. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 53-61, 2013.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa da distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no Campus de Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005.

VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E.; DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.37, p.2329- 2333, 2005.

- VAFADAR, F.; AMOOAGHAIE, R.; OTROSHY, M. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 9, n. 1, p. 128-136, 2014.
- VILAR, J.; PEREIRA, J. E. **La olivicultura internacional**: Difusión histórica, análisis estratégico y visión descriptiva. 1 ed. Espanha: Fundación Caja Rural de Jaén, 2018. 158p.
- VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005.
- YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.
- ZAADY, E.; PEREVOLOTSKY, A.; OKON, Y. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions *Azospirillum brasilense* Cd. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 25, p. 819-823, 1993.

**APÊNDICE**

## Composição da solução salina para diluição

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
NaCl	0,1 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g L <sup>-1</sup>
KOH	4,5 g L <sup>-1</sup>
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
<b>pH: 7</b>	

Fonte: Döbereiner et al. (1995)

## Composição do meio de cultura NFb

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
Ácido málico	5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
NaCl	0,1 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g L <sup>-1</sup>
KOH	4,5 g L <sup>-1</sup>
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL
Solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH)	2 mL
Solução de FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Meio semi-sólido: 1,5 g de ágar	
Meio sólido: 15g de ágar e 0,05 g de extrato de levedura	
<b>pH: 6 ou 6,5</b>	

Fonte: Döbereiner et al. (1995)

## Composição do meio de cultura JNFb

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
Ácido málico	5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
NaCl	0,1 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g L <sup>-1</sup>
KOH	4,5 g L <sup>-1</sup>
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL
Solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH)	2 mL
Solução de FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Meio semi-sólido: 1,5 g de ágar	
Meio sólido: 17 g de ágar e 0,02 g de extrato de levedura	<b>pH: 5,8</b>

Fonte: Döbereiner et al. (1995)

## Composição do meio de cultura LGI

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
Sacarose ou açúcar cristal	5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g L <sup>-1</sup>
Solução de vitaminas	1 mL
Solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH)	5 mL
Solução de FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Meio semi-sólido: 1,5 g de ágar	
Meio sólido: 15 g de ágar/ 0,02 g de extrato de levedura	<b>pH 6</b>

Fonte: Döbereiner et al. (1995)

## Composição do meio líquido Dygs, padronizado para pH 6

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
Glucose	2 g L <sup>-1</sup>
Peptona bacteriológica	1,5 g L <sup>-1</sup>
Extrato de levedura	2 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g L <sup>-1</sup>
Ácido glutâmico	1,5 g L <sup>-1</sup>
Meio sólido: 15 g de ágar	

Fonte: Rodrigues Neto, Malavolta e Victor (1986)