

## BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS E ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

NON-SYMBIOTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA AND THE ROOTING OF OLIVE SEMI-HARDWOOD CUTTINGS (*Olea europaea* L.)

Talita Filomena Silva<sup>1</sup> Rogério Melloni<sup>2</sup> Eliane Guimarães Pereira Melloni<sup>3</sup> Emerson Dias Gonçalves<sup>4</sup>

### RESUMO

Bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) atuam no desenvolvimento das plantas principalmente por meio da fixação biológica de nitrogênio e pela produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Não há descrito na literatura internacional o efeito dessas bactérias no enraizamento de estacas de oliveira, o qual tem sido proporcionado pelo uso de tratamento hormonal à base de ácido indolbutírico (AIB). Em vista disso, este trabalho objetivou avaliar a diversidade fisiológica de isolados obtidos em amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos (Itajubá - MG) e de estirpes-tipo de BDNS, 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 isolados foram distribuídos em 5 grupos (G1 a G5) de acordo com suas características fenotípicas culturais baseadas em cor, diâmetro e consistência das colônias, e as estirpes-tipo utilizadas foram *Azospirillum brasilense* (BR11001<sup>1</sup>), *Azospirillum amazonense* (BR11040<sup>2</sup>), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175<sup>3</sup>) e *Burkholderia brasilensis* (BR11340<sup>4</sup>). A diversidade fisiológica foi avaliada através de experimentos de solubilização de fosfato, tolerância a diferentes condições de pH, temperatura e produção de ácido indolacético (AIA). Para avaliação do potencial de enraizamento nas estacas semilenhosas de oliveira foram utilizados as cultivares Ascolano 315, Arbequina e Grappolo 541, oriundas do banco de germoplasma da FEMF-EPAMIG. Aplicaram-se 33 tratamentos, nos quais as estacas foram inoculadas com os grupos de isolados bacterianos, com as estirpes-tipo, sem inoculação (controle) e apenas com AIB, comercialmente utilizado na FEMF-EPAMIG. Apenas dois isolados mostraram capacidade de solubilização de fosfato. Os grupos de isolados e das estirpes-tipo apresentaram exigências ambientais muito similares com amplas faixas de condições ótimas de pH (5,0 a 9,0) e temperatura (15-35°C) para máximo crescimento. Os isolados e estirpes-tipo apresentaram uma produção de AIA variando de 110,53 a 383,58 µg mL<sup>-1</sup>, sendo que os grupos dos isolados, em geral, não diferiram significativamente dos valores obtidos pelas estirpes-tipo. Todos os grupos de isolados apresentam potencial de enraizamento de estacas de oliveira, sendo aqueles dos grupos 1 e 4 mais indicados para cultivar Arbequina, grupo 2 para a Grappolo 541 e grupos 1 e 5 para a Ascolano 315, com desempenhos semelhantes àquele proporcionado pelo AIB.

**Palavras-chave:** bactérias endofíticas; bactérias promotoras de crescimento; diversidade fisiológica; olivicultura.

### ABSTRACT

Non-symbiotic diazotrophic bacteria (NSDB) influence plant growth mainly through biological nitrogen

1 Engenheira Ambiental, Mestre em Ciências de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Itajubá, Av. BPS, 1303, Bairro Pinheirinho, CEP 37500-903, Itajubá (MG), Brasil. Bolsista Fapemig. talitafsilva@yahoo.com.br

2 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Instituto de Recursos Naturais, Universidade Federal de Itajubá, Av. BPS, 1303, Bairro Pinheirinho, CEP 37500-903, Itajubá (MG), Brasil. rmelloni@unifei.edu.br

3 Engenheira Agrônoma, Dr<sup>a</sup>., Professora do Instituto de Recursos Naturais, Universidade Federal de Itajubá, Av. BPS, 1303, Bairro Pinheirinho, CEP 37500-903, Itajubá (MG), Brasil. elianegp@unifei.edu.br

4 Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), Rua Washington Viglione, Bairro Vargedo, CEP 37518-000, Maria da Fé (MG), Brasil. emerson@epamig.br

fixation and production and release of plant growth-regulating substances. The effect of these bacteria on rooting of olive is not described in the international literature, which has been provided by the use of hormonal treatment based on indole butyric acid (IBA). The purpose of this study was to evaluate the physiological diversity of isolates obtained from soil samples of the Biological Reserve Serra dos Toledos, Itajubá, MG state, and of reference strains of NSDB, and their potential of substitution of IBA on rooting of olive semi-hardwood cuttings from the experimental farm 'Maria da Fé' (FEMF-EPAMIG). The isolates were divided into five groups (G1 to G5) according with cultural phenotypic characteristics based on color, diameter and consistence of colonies, and reference strains used were *Azospirillum brasilense* (BR11001<sup>t</sup>), *Azospirillum amazonense* (BR11040<sup>t</sup>), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175<sup>t</sup>) and *Burkholderia brasilensis* (BR11340<sup>t</sup>). The diversity of physiological was performed using phosphate solubilization, tolerance to different conditions of temperature and pH and production of indole acetic acid (IAA). To evaluate the potential of semi-hardwood cuttings rooting in olive cultivars were used the cultivars Ascolano 315, Arbequina and Grappolo 541, from the germoplasm bank of the FEMF-EPAMIG. There were 33 treatments, and the cuttings were inoculated with the bacterial isolate groups, with the reference strains, without inoculation (control) and only IBA, commercially used in rooting. Only two isolates showed ability to solubilize phosphate. Groups of isolates and of reference strains showed very similar environmental requirements, with wide ranges of optimum conditions of pH (5,0-9,0) and temperature (15-35°C) for maximum growth. The isolates and reference strains showed a production IAA ranging from 110.53 to 383.58  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the groups of isolates generally did not differ significantly from the values obtained by reference strains. All the groups of isolates present potential of rooting of olive cuttings, and those of groups 1 and 4 are more indicated to Arbequina, group 2 to Grappolo 541 and groups 1 and 5 to Ascolano 315, with performances similar to those obtained from IBA.

**Keywords:** endophytic bacteria; growth-promoting bacteria; physiological diversity; oliviculture.

## INTRODUÇÃO

As associações entre bactérias diazotróficas e plantas não leguminosas são denominadas comumente de simbiose associativa ou fixação de nitrogênio associativa (BALDANI et al., 1997), possuindo a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos das plantas sem, contudo, causarem sintomas de doenças (REIS et al., 2006). Essas bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS), assim chamadas por Kennedy, Choudhury e Kecskés (2004), podem desempenhar importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois além de incorporarem nitrogênio por meio da fixação biológica (BALDANI et al., 2002), produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), atuam na solubilização de fosfatos (SHUKLA et al., 2008), podem aumentar os teores de C orgânico e do N do solo, além de contribuir com a retenção de nutrientes na rizosfera das plantas (YADAV et al., 2009). Entre as BDNS mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. As bactérias diazotróficas associativas como *Herbaspirillum* e *Burkholderia* têm grande potencial de fixação biológica de nitrogênio em associação com plantas não leguminosas, como arroz, milho, cana-de-açúcar, entre outras (FERREIRA; GUIMARÃES; BALDANI, 2011). Trabalhos envolvendo a produção de inoculantes são diversos, destacando aquele desenvolvido por Guimarães, Baldani e Jacob-Neto (2013) sobre a manutenção da viabilidade celular das bactérias diazotróficas não simbióticas.

A inoculação de bactérias diazotróficas responde diferentemente ao genótipo da planta, ao tipo de solo e ao ambiente (OLIVEIRA et al., 2006; VITORIZI FILHO et al., 2012). Schultz et al. (2012) e Pereira et al. (2013), avaliando o efeito da inoculação de diferentes variedades de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas individuais e em mistura, observaram grande variação no acúmulo de biomassa vegetal e ausência de respostas em algumas variedades. No entanto, estudos feitos por Oliveira et al. (2006), avaliando a quantificação da fixação biológica de nitrogênio pela população natural de bactérias e pelo efeito da inoculação de misturas bacterianas, mostraram resposta positiva sobre a fixação biológica, com contribuições médias entre 30 e 60% do nitrogênio acumulado na planta.

A oliveira (*Olea europaea* L.) cultivada é uma árvore de tamanho médio e formato arredondado, cujo porte, densidade da copa, comprimento de entrenós e cor da madeira variam em função da variedade

e de condições de cultivo (OLIVEIRA; ABRAHÃO, 2006). Um dos métodos mais utilizados atualmente para a sua propagação é através do enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização, com tratamento hormonal antes do plantio (CABALLERO; DEL RÍO, 2006). A oliveira origina-se de regiões cujo tipo climático é caracterizado por inverno chuvoso e verão seco (WALTER; BRECKLE, 1991). A introdução da oliveira em *habitat* diferente do seu original, mais especificamente no sul de Minas Gerais, região que se caracteriza por estações climáticas bem definidas, pode causar distúrbios na planta e com isso influenciar seu processo de crescimento, desenvolvimento, bem como sua produção. Dessa forma, o uso de variedades melhoradas, associadas com técnicas de manejo desenvolvidas nas condições brasileiras, é um dos fatores que pode maximizar o processo fotossintético e possibilitar o desenvolvimento adequado das plantas de oliveira, além de melhorar a produção (LIVRAMENTO; OLIVEIRA, 2006). No entanto, a maioria dos estudos de oliveira no Brasil e no mundo tem sido direcionada à produção e ao manejo, e poucos relacionados com os microrganismos do solo e seus processos, sendo que os microrganismos podem contribuir para a melhoria dos processos de produção de maneira geral. O estudo da inoculação de BDNS no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira é pioneiro e de suma importância na produção de mudas e disseminação da cultura no Brasil. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade fisiológica e o potencial de utilização de isolados dessas bactérias no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira, importante fase da produção de mudas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido nas dependências da Fazenda Experimental de Maria da Fé, MG, (FEMF-EPAMIG) e os ensaios microbiológicos no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Itajubá - MG, em meados de 2010 e 2011. Foram utilizados 17 isolados de BDNS, obtidos de amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá - MG, em setembro/2006 e abril/2007 (SILVA; MELLONI, 2011) e quatro estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>t</sup>), *Azospirillum amazonense* (BR 11040<sup>o</sup>), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175<sup>o</sup>) e *Burkholderia brasilensis* (BR 11340<sup>t</sup>), provenientes da Embrapa-Seropédica, RJ.

A técnica de crescimento bacteriano esteve de acordo com Baldotto et al. (2010), com modificações. Porções das colônias dos tubos *eppendorf* dos isolados bacterianos selecionados e das estirpes-tipo foram transferidas para *erlenmeyers* contendo meio líquido Dygs (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) e submetidos à agitação em temperatura ambiente por três dias, sendo este o tempo necessário para que atingissem a fase logarítmica (NÓBREGA et al., 2004).

Para o teste de solubilização de fosfato, alíquotas de 2 µL das suspensões bacterianas (BALDOTTO et al., 2010) dos isolados e estirpes-tipo de BDNS foram colocadas em miniplacas de Petri contendo meio de cultura GES sólido (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). A formação do halo translúcido que se forma em torno de colônias bacterianas solubilizadoras foi considerada como resultado positivo (MEHNAZ et al., 2010). Todo o processo de inoculação foi realizado em triplicata e as placas incubadas a 28°C por três dias.

O teste de crescimento em diferentes condições de pH seguiu conforme Florentino et al. (2010), onde alíquotas de 0,1 mL das suspensões bacterianas dos isolados e estirpes-tipo foram inoculadas em miniplacas de Petri contendo meio Dygs sólido e espalhadas com alça de Drigalsky. O meio Dygs teve as condições de pH alteradas pela adição de NaOH ou HCl, a fim de se obterem os seguintes valores: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; e 9,0 (WEI et al., 2008). O controle foi feito utilizando-se o meio Dygs com pH 6,4, sem modificações, conforme proposto por Rodrigues Neto, Malavolta Junior e Victor (1986). A tolerância às condições de pH foi observada através da porcentagem de crescimento bacteriano em relação à área superficial do meio de cultura. Assim como o proposto em Trannin et al. (2001), foram atribuídos valores às médias dos percentuais de crescimento, para cada condição de pH: 0 (ausência de crescimento), 1 (1-19%), 2 (20-39%), 3 (40-59%), 4 (60-79%) e 5 (80-100%). Para avaliação da faixa ótima de crescimento bacteriano por grupo, considerou-se o somatório das notas atribuídas para cada valor de pH. Valor igual ou acima de 85% do somatório total das notas foi considerado condição ótima para crescimento. O procedimento e a avaliação da porcentagem de crescimento foram os mesmos realizados com os diferentes valores de pH, temperaturas de 10°C, 15°C e 20°C, complementares àquelas utilizadas por Florentino et al. (2010), ou seja, 35°C, 40°C e 45°C.

A quantificação da produção de AIA pelos isolados de BDNS obtidas de amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá - MG (SILVA; MELLONI, 2011) foi feita conforme metodologia de Kuss et al. (2007), em que alíquotas de 0,5 mL de solução de cada um dos isolados e estirpes, ajustadas para DO 0,5, foram colocadas para crescimento em meio líquido Dygs e agitadas por 72 horas a 30°C. Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidos para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante obtido, 3 mL foram vertidos em frascos, aos quais foram adicionados 2 mL de reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). Os frascos foram armazenados em ambiente escuro por 30 minutos para desenvolvimento de cor, que se apresenta em tons rosa-avermelhados mais intensos quando há maior quantidade de ácido indolacético, sendo a intensidade da cor determinada em espectrofotômetro a 530 nm (SILVA, 2010). Assim como em Galdiano Júnior (2009), a concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva padrão, previamente preparada com quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de uma solução 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de ácido 3-indolacético comercial padrão (Sigma-Aldrich®), e 2 mL do reagente de Salkowski em cada frasco. A equação obtida da curva padrão foi  $y = 0,0024x + 0,0144$  ( $R^2 = 0,9952$ ). Os dados expressos em µg mL<sup>-1</sup> foram submetidos à análise de variância (incluindo normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias) e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009) e seu complementar Tinn R.

Para o experimento de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira com a inoculação de BDNS, os isolados foram distribuídos em 5 grupos, sendo dois grupos com 4 isolados e três grupos com 3 isolados. Os grupos e seus isolados foram: G1 (isolados 8, 14 e 16), G2 (isolados 17, 38 e 39), G3 (isolados 31 e 32), G4 (isolados 42 e 43) e G5 (isolados 47 e 48). A distribuição foi feita enquadrando-se isolados que se encontravam dentro de um mesmo grande grupo no dendrograma de similaridade em Silva e Melloni (2011). O experimento foi instalado em casa de vegetação (unidade de produção de mudas de oliveira por estacas enraizadas) da Fazenda Experimental de Maria da Fé - MG, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (FEMF-EPAMIG). O experimento foi montado com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 11 x 3 x 5, sendo 11 fontes produtoras de hormônio (5 grupos de bactérias + 4 estirpes-tipo + 1 controle + 1 hormônio), 3 cultivares de oliveira (Grappolo 541, Arbequina e Ascolano 315) e 5 repetições. Tendo em vista que o ácido indolbutírico (AIB) é comumente empregado na Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF-EPAMIG) como hormônio sintético para estimular e acelerar o enraizamento de estacas (OLIVEIRA et al., 2010a; 2010b), utilizou-se este como uma forma de comparação ao tratamento de inoculação com as bactérias selecionadas. O controle foi realizado para comparação do enraizamento sem inoculação de bactérias e sem aplicação do hormônio AIB.

Os cultivares de oliveira do banco de germoplasma da FEMF-EPAMIG utilizados foram Grappolo 541, Arbequina e Ascolano 315. As estacas foram preparadas conforme Oliveira et al. (2010a) e transportadas ao laboratório onde as estacas foram desinfestadas de acordo com Andrade e Hamakawa (1994). A técnica de inoculação e o tratamento controle foram feitos com base em Baldotto et al. (2010), com modificações. As suspensões das bactérias dos cinco grupos montados e das quatro estirpes-tipo foram colocadas em tubos de ensaio, nos quais as estacas tiveram seus caules imersos por 60 minutos, sendo este o dobro do tempo deixado em Baldotto et al. (2010), para assegurar o maior tempo de contato da suspensão bacteriana com o caule da estaca.

No tratamento controle, as estacas tiveram seus caules imersos em meio líquido Dygs autoclavado também por 60 minutos. No tratamento hormônio não houve imersão das estacas em meio de cultura. Neste caso, as bases das estacas foram mergulhadas em ácido indolbutírico (AIB) com concentração de 3 g L<sup>-1</sup> em solução 50% de água destilada e 50% de álcool, por cinco segundos, conforme as recomendações de Oliveira et al. (2010a).

As estacas foram plantadas individualmente em copos contendo perlita, esterilizada em autoclave a 121°C por 1 h e seca em estufa a 170°C por 1 h, substrato normalmente empregado para o enraizamento de estacas de oliveira (DEL RÍO; CABALLERO, 2005). Nos tratamentos dos grupos de bactérias e estirpes-tipo, o substrato foi infestado com meio bacteriano restante no tubo de ensaio, após imersão das estacas, conforme Mello et al. (2002). Imediatamente após o plantio, as estacas foram irrigadas para serem transportadas até a FEMF. A casa de vegetação da FEMF apresenta temperatura controlada em 25 ± 2°C, com sistema de nebulização intermitente, os copos foram distribuídos de acordo com os tratamentos.

Após seis meses foi feita a retirada das estacas da perlita, sendo verificados em todos os tratamentos os seguintes atributos: porcentagem de estacas mortas (sem formação de calo e raízes), de estacas com calo e de estacas com calo enraizadas; número médio de raízes; comprimento médio de raízes; porcentagem de estacas com folhas verdes; número médio de folhas verdes; porcentagem de estacas com brotação; número médio de brotações e comprimento médio de brotações, conforme trabalhos de Pio et al. (2005), Oliveira et al. (2010a; 2010b) e Vieira Neto et al. (2010). Os resultados dos atributos avaliados foram submetidos à análise de componentes principais, utilizando-se o programa PC-ORD 3.12 (MCCUNE; MEFFORD, 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente os isolados bacterianos de números 32 e 47, pertencentes aos grupos G3 e G5, respectivamente, apresentaram formação do halo transparente em torno da colônia, caracterizando solubilização de fosfato, que pode influenciar o mecanismo de promoção de crescimento das bactérias às plantas (BISWAS; LADHA; DAZZ, 2000). Segundo Pedrinho (2009), para que a quantidade de fósforo liberado por bactérias solubilizadoras fosse suficiente para promover o crescimento vegetal, dever-se-ia promover a inoculação desses microrganismos em concentrações elevadas. Neste estudo, em virtude da diversidade de isolados de bactérias em um mesmo grupo, a densidade específica daquelas solubilizadoras pode não ter sido suficiente para promover o crescimento das plantas.

As notas referentes ao percentual de crescimento médio de cada isolado bacteriano e estirpe-tipo para cada valor de pH e temperatura, indicaram que houve variação no comportamento do crescimento entre os isolados dentro de um mesmo grupo, mostrando assim a diversidade fisiológica de cada um destes perante as condições analisadas. Tendo em vista que a temperatura média da casa de vegetação é de 25°C, os resultados mostraram que os isolados possuem capacidade de crescimento nesse ambiente. As amplas faixas das condições ótimas de pH e temperatura para máximo crescimento dos grupos de isolados e das estirpes-tipo (Tabela 1) indicaram que os grupos apresentaram exigências ambientais muito similares quanto ao máximo crescimento. Esta característica garante melhor adaptação às diferentes condições edafoclimáticas a que a oliveira pode ser submetida, além de facilitar o cultivo e produção de inóculo de BDNS em laboratório.

Os resultados da produção de AIA (Figura 1) mostraram variação nos isolados bacterianos dentro dos grupos e entre estes. Os isolados de números 13, 26, 30, 33 e 50 não apresentaram produção de AIA. Os valores obtidos nas estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* foram superiores às mesmas estirpes-tipo testadas em Kuss et al. (2007) com produção de 5,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Azospirillum*

TABELA 1: Faixa de crescimento ideal de pH e temperatura dos agrupamentos analisados de Bactérias diazotróficas não simbióticas.

TABLE 1: Range of growth pH and optimum temperature of clusters of non-symbiotic diazotrophic bacteria analyzed.

Agrupamento	Condição ótima de crescimento	
	pH	Temperatura (°C)
G1	5,0 – 6,4	15 – 40
G2	5,0 – 8,0	15 – 35
G3	5,0 – 7,0	15 – 40
G4	5,0 – 9,0	15 – 45
G5	5,0 – 9,0	15 – 35
Estirpes-tipo	5,0 – 9,0	15 – 35

Em que: G1 = isolados 8, 14 e 16; G2 = isolados 17, 38 e 39; G3 = isolados 31 e 32; G4 = isolados 42 e 43; G5 = isolados 47 e 48; Estirpes-tipo = *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*.

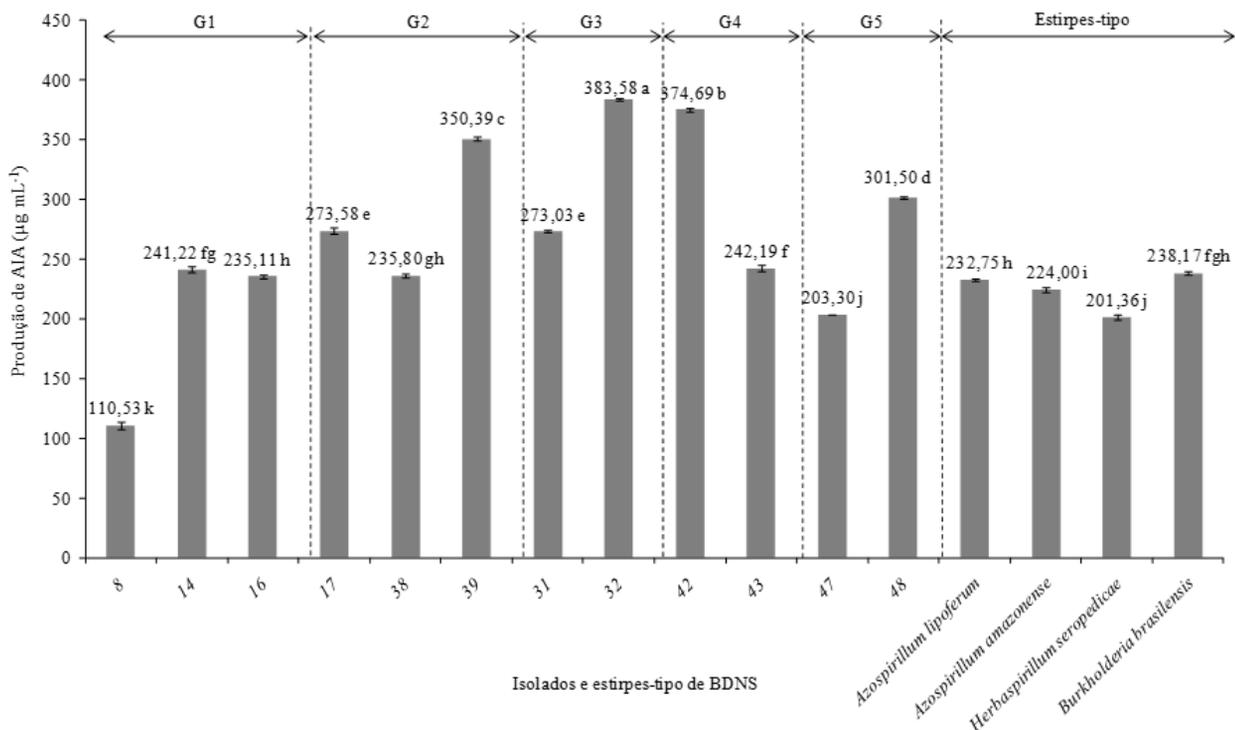


FIGURA 1: Produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas obtidos de amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledo's (Itajubá - MG), nos diferentes grupos fenotípicos (G1: isolados 8, 14 e 16; G2: isolados 17, 38 e 39; G3: isolados 31 e 32; G4: isolados 42 e 43; G5: isolados 47 e 48); e estirpes-tipo (*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*). Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

FIGURE 1: Production of indole acetic acid (IAA) by isolates of non-symbiotic diazotrophic bacteria, from Biological Reserve 'Serra dos Toledo's (Itajubá-MG state), in different phenotypic groups (G1: isolates 8, 14 e 16; G2: isolates 17, 38 e 39; G3: isolates 31 e 32; G4: isolates 42 e 43; G5: isolates 47 e 48; e strains (*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia brasilensis*). Means followed by the same letter do not differ significantly by Tukey test at 5% of significance level.

*brasilense*, e Galdiano Júnior (2009) com produção de 42,5 e 105,7 µg mL<sup>-1</sup> para *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, respectivamente. Apenas o isolado 8 do grupo G1 apresentou produção de AIA abaixo do valor mínimo das estirpes, mostrando que os grupos dos isolados em geral tiveram valores estatisticamente iguais ou superiores aos obtidos pelas estirpes-tipo.

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

Quanto à produção decrescente de AIA, destacam-se os isolados 32, 42 e 39, respectivamente, pertencentes aos grupos 3, 4 e 2, com valores muito acima dos observados para estirpes-tipo em condições diversas. Cabe lembrar que a produção de AIA foi avaliada de forma independente, mas que os isolados foram combinados na forma de coquetel, cuja produção final de AIA não foi determinada. Tal fato deve ser valorado no sentido de redirecionar novas pesquisas relacionadas à produção de inóculo para enraizamento de estacas de oliveira ou desenvolvimento de outras espécies vegetais.

De posse dos valores médios dos atributos relacionados à avaliação do potencial de enraizamento

de estacas semilenhosas de oliveira pela inoculação de BDNS (Tabela 2), aplicou-se a análise multivariada, com componentes principais apresentados na Figura 2.

Os componentes principais apresentados (Figuras 2a, 2b) compuseram 74,8% da variância total dos dados, sendo que o PC1 apresentou 42,3% da variância, o PC2 18,4% e o PC3 14,1% do total. Os tratamentos, em sua grande maioria, ocuparam posições irregulares nos quadrantes, independentemente da cultivar e inóculo. O comportamento das estacas inoculadas com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis* foi variado, ora relacionado ao maior enraizamento, ora à produção de AIA (Figura 2).

No entanto, verifica-se que os tratamentos com hormônio comercial AIB para as três cultivares de oliveira (ArbHrm, AscHrm e GrapHrm) ocuparam posições próximas entre si (círculo em linha grossa), com relação estreita aos atributos de enraizamento das estacas (destacados em retângulo) e inversa à produção de AIA pelas bactérias estudadas (Figuras 2a, 2b). Os tratamentos que utilizaram grupos 1 (isolados 8, 14 e 16) e 4 (isolados 42 e 43) para Arbequina e grupo 2 (isolados 17, 38 e 39) para Grappolo 541 se posicionaram próximos aos atributos ligados ao enraizamento (Figura 2a), destacando-se como potencialmente capazes de promoverem o calejamento e enraizamento das estacas, da mesma forma que aquelas tratadas com hormônio comercial AIB. Além desses, outros tratamentos entre cultivar de oliveira e grupos de isolados com potencial de utilização para enraizamento foram aqueles envolvendo Grappolo 541 inoculado com os grupos 3 (isolados 31 e 32), 4 ou 5 (isolados 47 e 48), e Ascolano 315 inoculado com os grupos 1 ou 5 (Figura 2b). Esse comportamento corresponde, em parte, ao apresentado pelos atributos de enraizamento exposto na Tabela 2, mas é contrário ao apresentado pelos isolados quanto à produção de AIA. Esse resultado sugere que o potencial de enraizamento desses grupos bacterianos pode não estar associado diretamente e somente à produção de AIA (Figura 1) ou à resistência a diferentes condições de pH e temperatura (Tabela 2), mas a outros fatores não avaliados no presente trabalho.

Recomenda-se que novos estudos de inoculação sejam realizados utilizando os isolados promissores de enraizamento, tanto de forma independente (por exemplo, 32, 39 e 42, em função dos valores de AIA apresentados na Figura 1), quanto combinados na forma de coquetel, conforme também recomendado por outros pesquisadores que estudam o potencial de inóculo de BDNS no desenvolvimento de plantas (GUIMARÃES; BALDANI; JACOB-NETO, 2013; PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012; VITORAZI FILHO et al., 2012).

## CONCLUSÕES

Os isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas 8, 14, 16, 17, 31, 32, 38, 39, 42, 43, 47 e 48, obtidos de amostras de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos (Itajubá - MG), apresentaram alta diversidade fisiológica, mostrando exigências ambientais com amplas faixas de condições ótimas de pH (5,0 a 9,0) e temperatura (15-35°C), solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético (110,53 a 383,58  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Todos os grupos de isolados apresentaram potencial de enraizamento de estacas de oliveira, sendo aqueles do grupo 1 (isolados 8, 14 e 16) e 4 (isolados 42 e 43) mais indicados para a cultivar Arbequina, grupo 2 (isolados 17, 38 e 39) para a Grappolo 541 e grupos 1 e 5 (isolados 47 e 48) para a Ascolano 315, com desempenhos semelhantes àquele proporcionado pelo uso do hormônio comercial ácido indolbutírico.

O potencial de enraizamento de estacas das cultivares de oliveira não está relacionado exclusivamente à produção do ácido indolacético ou às demais características dos isolados quanto à solubilização de fosfato, exigência de pH ou de temperatura para crescimento. Dessa forma, novos estudos são sugeridos utilizando os isolados de forma independente e em coquetel para que futuras recomendações sejam indicadas para o processo de enraizamento de estacas de oliveira.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fazenda Experimental de Maria da Fé/MG (FEMF-EPAMIG), pelo apoio.

TABELA 2: Médias dos atributos relacionados ao potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira pela inoculação de bactérias diazotróficas não simbióticas.

TABLE 2: Averages of attributes related to the potential of rooting olive semi-hardwood cuttings by inoculation of non-symbiotic diazotrophic bacteria.

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

Em que: <sup>(1)</sup> Cultivar Grap (Grappolo 541), Arb (Arbequina), Asc (Ascolano 315) inoculado com isolados dos Grupos 1 ao 5; G1 = isolados 8, 14 e 16; G2 = isolados 17, 38 e 39; G3 = isolados 31 e 32; G4 = isolados 42 e 43; G5 = isolados 47 e 48 ou com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (Abr), *Azospirillum amazonense* (Aam), *Herbaspirillum seropedicae* (Hsp) e *Burkholderia brasilensis* (Bbr). Ctr (controle, não inoculado); PEM = Porcentagem de estacas mortas (PEM), Porcentagem de estacas com calo (PEC), Porcentagem de estacas com calo enraizadas (PECE), Número médio de raízes (NMR), Comprimento médio de raízes (CMR), Porcentagem de estacas com folhas verdes (PEF), Número médio de folhas verdes (NMF), Porcentagem de estacas com brotação (PEB), Número médio de brotações (NMB) e Comprimento médio de brotações (CMB).

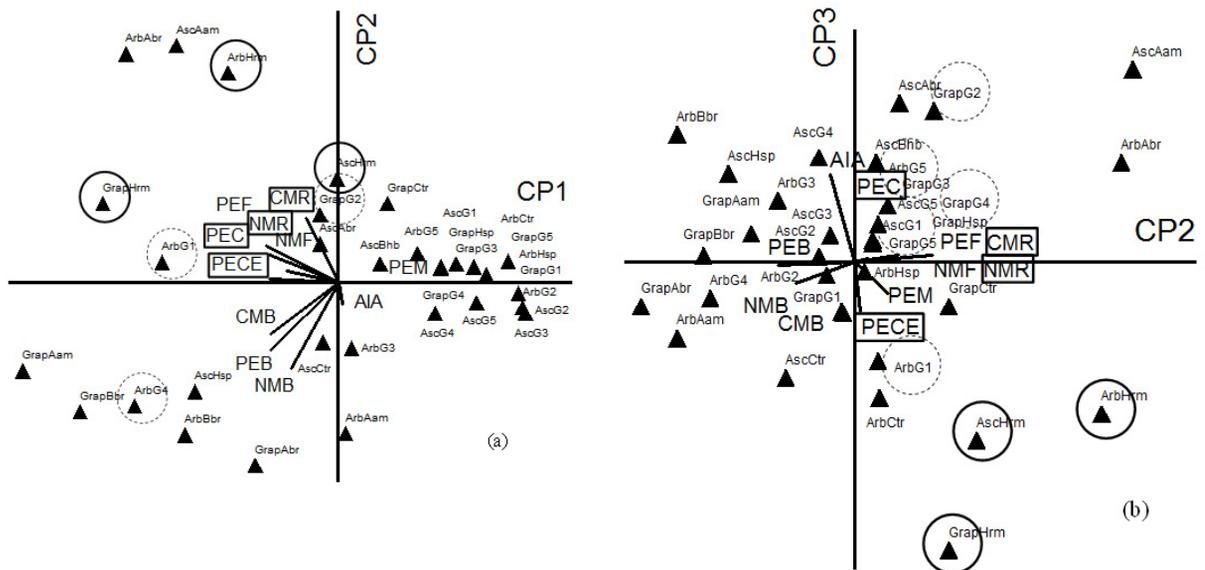


FIGURA 2: Resultado da análise de componentes principais (CP) para os atributos relacionados à sobrevivência e desenvolvimento das estacas diante dos diferentes tratamentos (▲), sendo CP1 x CP2 (a) e CP2 x CP3 (b). Círculo em linha cheia grossa ao redor do tratamento indica imersão das estacas no hormônio ácido indolbutírico, círculo em linha tracejada indica os tratamentos com inoculação de isolados com respostas semelhantes àquelas envolvendo as estirpes-tipo. Cultivar Grap (Grappolo 541), Arb (Arbequina), Asc (Ascolano 315) inoculado com isolados dos Grupos 1 ao 5 (G1: isolados 8, 14 e 16; G2: isolados 17, 38 e 39; G3: isolados 31 e 32; G4: isolados 42 e 43; G5: isolados 47 e 48) ou com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense* (Abr), *Azospirillum amazonense* (Aam), *Herbaspirillum seropedicae* (Hsp) e *Burkholderia brasilensis* (Bbr). Ctr (controle, não inoculado). Tratamentos: Destaque em retângulo estão diretamente relacionados ao enraizamento (CMR – comprimento médio de raízes, NMR – número médio de raízes, PEC – % de raízes com calo, PECE – % de raízes com calo enraizadas), AIA – produção de ácido indolacético, CMB – comprimento médio de brotações, NMF – número médio de folhas verdes, NMP – número médio de brotações, PEB - % de estacas com brotação, PEF - % de estacas com folhas verdes e PEM – % de raízes mortas.

FIGURE 2: Results of principal component analysis (PC) for attributes related to the survival and development of the different treatments on cuttings (▲), with CP1 x CP2 (a) and CP2 x CP3 (b). Circle in thick solid line indicates treatment around the immersion of the cuttings in hormone indolbutiric acid, and the dashed line indicate the treatments inoculated with isolates with responses similar to those involving strains. Grap (Grappolo 541), Arb (Arbequina), Asc (Ascolano 315) inoculated with isolates from Groups 1 to 5 (G1: isolates 8, 14 e 16; G2: isolates 17, 38 e 39; G3: isolates 31 e 32; G4: isolates 42 e 43; G5: isolates 47 e 48) and strains of *Azospirillum brasilense* (Abr), *Azospirillum amazonense* (Aam), *Herbaspirillum seropedicae* (Hsp) and *Burkholderia brasilensis* (Bbr). Ctr (not inoculated). Treatments: Featured in rectangle are directly related to rooting (CMR - average length of roots, NMR - average number of roots, PEC - % of roots with callus, PECE - % of roots with callus rooted), AIA - production of indoleacetic acid, CMB - average length of sproutings, NMF - average number of green leaves, NMP - average number of sproutings, PEB - % of cuttings with sproutings, PEF - % cuttings with green leaves and PEM - % of dead roots.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 63-94.
- BALDANI, J. I. et al. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 922-928, 1997.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, p. 349-360, 2010.
- BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZ, F. B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000.
- CABALLERO, J. M.; DEL RÍO, C. Propagação da oliveira por enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 33-38, 2006.
- DEL RÍO, C.; CABALLERO, J. M. Aptitud al enraizamiento. In: RALLO, L. et al. (Ed.). **Varietades de olivo en Espanã (Libro II: Variabilidad y selección)**. Madrid: Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, 2005. p. 276-281.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, Abingdon, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- FERREIRA, J.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 826-833, 2011.
- FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, p. 1113-1123, 2010.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Viabilidade do inoculante turfoso produzido com bactérias associativas e molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 10-15, 2013.
- KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.
- KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1459-1465, 2007.
- LIVRAMENTO, D. E.; OLIVEIRA, A. F. Ecofisiologia da oliveira, alguns aspectos de fotossíntese, temperatura e radiação solar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 27-32, 2006.
- MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.12. Glenden Beach: MjM Software, 1997.
- MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and Field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 1848-1856, 2010.
- MELLO, M. R. F. et al. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 222-228, 2002.
- NÓBREGA, R. S. A. et al. 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, MG, v. 28, p. 269-279, 2004.
- OLIVEIRA, A. F.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da oliveira (*Olea europaea* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 13-17, 2006.
- OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, n. 1/2, p. 23-32, 2006.

- OLIVEIRA, M. C. et al. Enraizamento de estacas de duas cultivares de oliveira submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes. **Bragantia**, Campinas, v. 69, p. 99-103, 2010a.
- OLIVEIRA, M. C. et al. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 34, p. 337-344, 2010b.
- PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*)**. 2009. 74 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- PEREIRA, W. et al. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotrófica. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.
- PIO, R. et al. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 29, p. 562-567, 2005.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, p. 12-16, 1986.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p. 261-269, 1995.
- SCHULTZ, N. et al. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 261-268, 2012.
- SHUKLA, S. K. et al. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 99, p. 158-168, 2008.
- SILVA, M. C. P. **Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha***. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá/MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, p. 359-371, 2011.
- SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.
- TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre “in vitro”. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, p. 305-316, 2001.
- VIEIRA NETO, J. et al. Fertilizantes na produção de mudas de oliveira ‘Arbequina’. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, p. 49-55, 2010.
- VITORAZI FILHO, José Antonio et al. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 34, n. 2, p. 442-450, 2012.
- WALTER, H.; BRECKLE, S. W. **Ökologische Grundlagen in globaler Sicht**. 2th ed. Stuttgart: Fischer, 1991.
- WEI, G. H. et al. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. **Microbiology Research**, Amsterdam, v. 163, p. 651-662, 2008.
- YADAV, R. L. et al. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 30, p. 296-303, 2009.