

Artigos

Isolamento, caracterização de rizobactérias e análise da produção de ácido indolacético visando ao enraizamento de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.)

Isolation, characterization of rhizobacteria and analysis of indole acetic acid production aiming at the rooting of olive (*Olea europaea* L.) cuttings

Polianna de Paula Ramos^I, Rogerio Melloni^{II}, Nara Luiza Pedrezzini Silva^{II}, Eliane Guimarães Pereira Melloni^{II}, Gustavo Magno dos Reis Ferreira^{III}, Luiz Fernando de Oliveira da Silva^{IV}, Thais Aparecida Costa da Silva^V

^IPesquisadora Autônoma, Itajubá, MG, Brasil

^{II}Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, Brasil

^{III}GM Engenharia e Meio Ambiente, Piranguinho, MG, Brasil

^{IV}Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Maria da Fé, MG, Brasil

^VInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Cachoeira de Minas, MG, Brasil

RESUMO

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são capazes de proporcionar o melhor desenvolvimento vegetal por meio de diversos mecanismos. Um desses mecanismos trata da produção de reguladores de crescimento vegetal, como por exemplo, o ácido indolacético (AIA). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi o isolamento, a caracterização fenotípica e a avaliação do potencial de produção de AIA de rizobactérias, obtidas da rizosfera de oliveiras (*Olea europaea* L.), visando a sua aplicação na indução do enraizamento durante a produção de mudas. Para isso, amostras de rizosfera de 17 diferentes cultivares de oliveira, do banco de germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Maria da Fé - MG, foram utilizadas para o isolamento de RPCP em meios de cultura JNFb, NFb e LGI, posteriormente caracterizadas fenotipicamente em meio batata-dextrose-ágar e submetidas ao teste de produção de AIA. Pôde-se observar efeito das cultivares no número de RPCP nos diferentes meios de cultura. Na caracterização fenotípica, os isolados de RPCP apresentaram alta similaridade entre si (93% a 100%). Quanto à produção de AIA, esses isolados apresentaram índices relevantes (0,16 e 29,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$) quando comparados a outros estudos, sendo aqueles obtidos no meio JNFb os maiores produtores. Pôde-se concluir que 11 isolados (KRJ2, GLJ2, G57J2, MFJ1, ADJ2, G57N1, AUSAL3, FTJ1, AUSAN1, AUSAJ2, KRN1), com produção acima de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, apresentam potencial de utilização em futuros testes na indução de enraizamento de estacas de plantas de oliveira.

Palavras-chave: Inoculante; Fitormônios; Mudanças

ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are capable of enhancing plant development through various mechanisms. One of them is the production of plant-growth regulators, e.g., indole acetic acid (IAA). On this basis, this study proposes to isolate, phenotypically characterize and evaluate the IAA production potential of rhizobacteria obtained from the rhizosphere of olive trees (*Olea europaea* L.), aiming at its application in the induction of rooting during seedling production. Samples of the rhizosphere of 17 olive cultivars from the germplasm bank of the Agricultural Research Corporation of Minas Gerais (EPAMIG), in Maria da Fé - MG, Brazil, were used for isolation of PGPR in JNFb, NFb and LGI culture media. Subsequently, they were characterized phenotypically in potato dextrose agar and subjected to an IAA production trial. There was an effect of cultivars on the number of PGPR in the different culture media. In phenotypic characterization, the PGPR isolates showed high similarity to each other (93% to 100%). These isolates showed relevant IAA production rates (0.16 and 29.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$) when compared with reports of other studies, and the isolates obtained in JNFb medium had the highest IAA production. In conclusion, 11 isolates (KRJ2, GLJ2, G57J2, MFJ1, ADJ2, G57N1, AUSAL3, FTJ1, AUSAN1, AUSAJ2 and KRN1), with IAA production rates above 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, have potential for use in future rooting induction trials in olive cuttings.

Keywords: Inoculant; Plant hormones; Seedlings

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta característica da região Mediterrânea, com cultivo disperso para diversos países, passando a ser conhecida pela produção de azeitonas e azeite de oliva (SANTOS *et al.*, 2015a). No Brasil, a olivicultura é uma atividade em expansão, cujo cultivo em escala comercial teve início há menos de uma década (SILVA *et al.*, 2012c). Atualmente, o país é considerado um grande importador de azeite de oliva e está posicionado entre os maiores consumidores no mundo (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2018). Em Maria da Fé (MG), o Núcleo Tecnológico da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) - Azeitona e Azeite, vem desenvolvendo pesquisas com a oliveira objetivando reverter a dependência das importações. O Núcleo possui um banco de germoplasma com diversos genótipos diferentes de oliveira, possibilitando que essas plantas sejam estudadas para melhoramento genético e experimentos relacionados a tratos culturais e produção, nas condições edafoclimáticas de Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2012a). Tais bancos se

caracterizam como patrimônio genético das espécies, permitindo o estudo de diversas cultivares, de origens diferentes, em mesmas condições de cultivo (SILVA *et al.*, 2012a).

Na produção de mudas de oliveira, outra forma de assegurar as características genéticas das espécies é pela propagação por estaquia. Dessa forma, permite-se explorar o potencial das plantas por meio da regeneração de raízes através de segmento de ramos, a qual leva à homogeneidade na produção, pela produção de mudas bem formadas, uniformes e frutos com características bem definidas (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Na estaquia em oliveira, a aplicação de reguladores de crescimento, muitas vezes, é fundamental para formação de raízes, os quais têm, por finalidade, o aumento da porcentagem de estacas que formam raízes, acelerar sua iniciação, aumentar número e a qualidade das raízes formadas e uniformizar o enraizamento (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Na ausência desses reguladores, o enraizamento natural não ocorre ou ocorre de forma desuniforme, prejudicando a produção comercial de mudas de oliveira. Porém, a utilização de formulações sintéticas de reguladores de crescimento vegetal na indução de enraizamento foi proibida, como o ácido indolbutírico (AIB), em países da Europa e Estados Unidos e na agricultura orgânica. Com isso, estudos utilizando sistemas alternativos para o melhoramento de enraizamento natural têm sido incentivados (ERTURK *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a utilização de microrganismos do solo na produção pode ser uma alternativa para promover o melhoramento do enraizamento natural dessa espécie. Um exemplo desses microrganismos são as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), encontradas na rizosfera, em associação com as raízes e em superfícies radiculares, capazes de promover melhor desenvolvimento das plantas, pela suplementação de nutrientes ou pela inibição ou redução de pragas e doenças por meio de antibióticos e antifúngicos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Além dessas, outras formas de melhorar e promover o desenvolvimento vegetal ocorrem por meio da mobilização de fosfato, inibição da síntese de etileno na planta, produção de sideróforos e outros oligoelementos para absorção pelas plantas (CANELLAS *et al.*, 2015).

As rizobactérias também são capazes de produzir reguladores de crescimento vegetal, os fitormônios, bem como auxinas, giberilinas, citocininas, entre outros (VEJAN *et al.*, 2016). O aumento da produtividade das culturas está diretamente relacionado à produção de hormônios de crescimento vegetal pelas rizobactérias 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 que possui capacidade de induzir o crescimento e formação de raízes e o aumento de pelos radiculares, permitindo, assim, maior absorção de água e de nutrientes presentes no solo, favorecendo o crescimento vegetal (CABALLERO-MELLADO, 2006).

A partir das capacidades de promoção de formação de raízes e de crescimento das plantas por parte das rizobactérias, elas passaram a ser avaliadas em estacas de oliveira (*Olea europaea* L.). No Brasil, Mariosa *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2017) conduziram os primeiros trabalhos que estudaram essa capacidade das bactérias, resultados positivos e promissores no enraizamento das estacas de oliveiras, quando comparados com o AIB, comercialmente utilizado. Com isso, o presente estudo objetivou isolar e caracterizar fenotipicamente rizobactérias promotoras do crescimento de plantas presentes na rizosfera de oliveiras do banco de germoplasma do Núcleo Tecnológico de Maria da Fé e analisar a produção de ácido indolacético (AIA) dos isolados, a fim de utilizá-los na indução do enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de rizobactérias utilizados neste trabalho foram obtidos da rizosfera de oliveiras do banco de germoplasma de oliveira instalado no ano de 2005, situado na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Maria da Fé, Sul de Minas Gerais a 22°18' de latitude Sul e 45°23' de longitude Oeste, altitude média de 1.276 metros e classificação climática de Köppen tipo Cwb, ou seja, clima temperado chuvoso (mesotérmico),

também denominado subtropical de altitude. O solo da área de estudo é do tipo Latossolo Vermelho, com textura média argilosa (SILVA *et al.*, 2012b). O banco 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 considerados uma importante fonte genética e agrônômica do país (SILVA *et al.*, 2012b).

2.1 Seleção das Cultivares para Amostragem da Rizosfera

Inicialmente, foi realizada a seleção das cultivares de oliveira das quais a rizosfera seria amostrada e estudada. Entre as 66 cultivares presentes no banco de germoplasma, selecionaram-se 17, considerando aspectos relacionados à diversidade de país de origem, quantidade (cultivares com mais de três plantas disponíveis no banco para servirem como três repetições), vigor das plantas (livres de pragas e doenças) e aptidão comercial para cultivo e produção. As selecionadas foram: Galega (GAL), Negrao (NEG), Grapollo 541 (GRA 541), Barnea (BAR), Leccino (LECC), Alto d'ouro (ALT), Frantoio (FRA), Tafahi (TAF), Maria da Fé (MDF), Arbequina (ARBE), Ascolano 315 (ASC 315), Arbosana (ARBO), Ascolano USA (ACS USA), Grapollo (GRA), Grapollo 575 (GRA 575), Mission (MISS) e Koroneiki (KOR).

Após a seleção, amostras da rizosfera foram coletadas em agosto de 2017 para análise. As amostras foram obtidas com auxílio de enxada manual, desinfestada utilizando álcool etílico 70% (v/v), em profundidade de 10 cm, realizados em três pontos ao redor de cada planta, com 20 cm de distância da base, baseando-se no Manual de Descrição e Coleta de Solo no Campo (SANTOS *et al.*, 2015b). Foi utilizado no estudo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo três repetições (3 plantas) por cultivar, totalizando 51 unidades experimentais. Cada uma das amostras da rizosfera coletadas foi acondicionada em sacos plásticos, identificada e peneirada em malha de 2 mm e, posteriormente, mantida em câmara fria (4°C) para realização das análises microbiológicas.

2.2 Quantificação e Isolamento das Rizobactérias

Para etapa de isolamento das rizobactérias, diluições sucessivas de 10 g das amostras de rizosfera foram realizadas em solução salina para diluição (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), de 10^{-2} a 10^{-6} , e foi inoculado 0,1 mL de cada suspensão em frascos contendo os meios de cultura semissólidos específicos, sendo três repetições por diluição. Os meios de cultura semissólidos utilizados foram: NFb para *Azospirillum* spp, JNFb para *Herbaspirillum* spp. e o meio LGI para *Azospirillum amazonense*, conforme Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). A escolha da utilização desses meios de cultura nas análises é devida à ausência de meio específico para isolamento de bactérias produtoras de AIA, além do fato dos isolados apresentarem, adicionalmente, a capacidade de fixação biológica de N_2 em condições onde há limitação desse nutriente (KUSS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2017). Para avaliar a densidade bacteriana, utilizou-se o método do número mais provável (NMP) (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). Os valores de NMP por g de solo seco foram submetidos ao teste de comparação de médias Scott-Knott a 5% de significância pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008).

2.3 Caracterização Fenotípica Cultural dos Isolados

A fase de caracterização fenotípica cultural dos isolados de rizobactérias foi baseada em Melloni *et al.* (2004). Os isolados dos meios sólidos foram transferidos para ágar-batata-dextrose, em triplicata, e realizada a caracterização com relação ao diâmetro, cor e consistência das colônias (Tabela 1), sendo estabelecidos 7 cores, 5 diâmetros e 4 tipos de consistência. Também foram caracterizadas fenotipicamente em ágar-batata-dextrose as estirpes-tipo *Azospirillum amazonense* (BR11040^T), *Azospirillum brasilense* (BR11001^T), *Azospirillum lipoferum* (BR11080^T), *Burkholderia brasilensis* (BR11340^T) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175^T), para realizar uma comparação com os isolados obtidos das rizosferas. Por meio da utilização do método *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), agruparam-se os isolados e estirpes-tipo caracterizados em dendrogramas de similaridade, pelo programa STATISTICA 10 (STATISTICA, 2010).

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

Cor	Diâmetro (mm)	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		

Fonte: Autores (2019)

2.4 Quantificação da Produção de AIA

A etapa de quantificação da produção de AIA dos isolados de rizobactérias foi baseada na metodologia de Kuss *et al.* (2007). Para isso, os isolados foram colocados para crescimento em *erlenmeyers* contendo 10 mL de meio líquido Dygs (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JÚNIOR; VICTOR, 1986) e por 72 horas em temperatura ambiente foram submetidos à agitação. Após esse período, foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min. Foi descartado o sobrenadante e adicionados 5 mL de solução salina 0,85% ao precipitado de células. Para ajuste da densidade ótica (DO) das suspensões, utilizou-se o espectrofotômetro (PerkinElmer, UV/VIS Spectrometer, Lambda 25) a 600 nm e, com base nos valores de absorbância, foram ajustadas, acrescentando-se alíquotas de solução salina até obter DO=0,5, utilizando a própria solução salina para leitura como branco.

Após o ajuste da DO, foi inoculado 0,500 mL da suspensão com os isolados em 20 mL de meio líquido Dygs e agitados por mais 72 horas a 30°C. Em seguida, foram centrifugados 15 mL de cada suspensão por 30 min a 3.600 rpm, até que ficasse translúcido. Após a centrifugação, 3 mL do sobrenadante foram 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 (1,35g 10 mL^{-1}), 50 mL de HClO_4 (35%). Os frascos com a suspensão foram armazenados em

ambiente escuro por 30 min para desenvolvimento de cor, na qual quanto mais intenso o tom de rosa-avermelhado maior a quantidade de ácido indolacético. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm, utilizando meio líquido Dygs autoclavado, com reagente Salkowski como branco para leitura.

Previamente, foi realizada a construção da curva-padrão com a concentração dos compostos indólicos para comparação com a produção dos isolados e estirpes-tipo segundo metodologia de Galdiano Júnior (2009). Isso foi feito a partir de diluições da solução de 1 mg mL⁻¹ de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich®), com a utilização do meio líquido Dygs esterilizado e quantidades conhecidas do hormônio, adicionadas 2 mL de reagente Salkowski para cada 3 mL da diluição. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações de AIA comercial (0, 50, 100, 200, 300 µg mL⁻¹) para gerar a equação. Para formação de cor, as diluições foram mantidas por 30 min em ambiente escuro e a intensidade da cor determinada em espectrofotômetro a 535 nm (KUSS *et al.*, 2007). Os valores obtidos de absorvância foram inseridos na equação resultante da curva-padrão para gerar os resultados expressos em µg mL⁻¹ de cada isolado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O NMP das RPCP na rizosfera de cada cultivar de oliveira, obtido pela formação de película nos meios semissólidos JNFb, NFb e LGI, está apresentado na Tabela 2.

No meio JNFb, foram obtidas médias que variaram de log NMP 5,35 a 7,13 g⁻¹ de solo seco, enquanto a variação no meio NFb foi de 4,53 a 6,88 e, no meio LGI, de 5,21 a 6,61. Sendo assim, foram observados maiores valores do número de RPCP no meio JNFb em cultivares de oliveira como Leccino, Frantoio, Alto D'oro, entre outras. É possível notar, também, variação no número de rizobactérias por grama de solo seco nas diferentes cultivares e em uma mesma cultivar, de acordo com o meio de cultura. Na rizosfera da cultivar Leccino, por exemplo, obtiveram-se, no meio JNFb, 7,01 g⁻¹ de solo seco, 5,25 g⁻¹ de solo seco no meio NFb e 6,47 g⁻¹ de solo seco no meio LGI. As cultivares de oliveira promoveram os maiores NMP na soma dos valores obtidos

em todos os meios de cultura como, por exemplo, Tafahi, Koroneiki, Ascolano USA e Frantoio (Tabela 2), em relação às demais. Pode-se explicar essa diferença significativa observada entre as cultivares a presença de exsudatos radiculares que são capazes de atrair microrganismos para região rizosférica (VALÉ *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Rizobactérias isoladas de amostras de solo rizosférico de cultivares de oliveira utilizando meio de cultura JNFb, NFb e LGI

Cultivares	Meios de Cultura			Total
	JNFb	NFb	LGI	
	log NMP rizobactérias/g de solo seco			
Galega	6,44 a	5,98 a	6,42 a	12,42
Negroa	5,72 b	4,53 b	5,95 a	10,25
Grapollo 541	5,88 b	4,53 b	6,29 a	10,41
Barnea	6,14 b	5,34 b	5,53 a	11,48
Leccino	7,01 a	5,25 b	6,47 a	12,26
Alto d'ouro	7,13 a	4,98 b	5,83 a	12,11
Frantoio	7,12 a	5,78 a	5,36 a	12,9
Tafahi	6,49 a	6,86 a	5,96 a	13,35
Maria da Fé	6,60 a	5,93 a	6,60 a	12,53
Arbequina	5,74 b	6,08 a	5,21 a	11,82
Ascolano 315	5,35 b	5,43 b	5,36 a	10,78
Arbosana	5,98 b	6,24 a	5,90 a	12,22
Ascolano USA	6,53 a	6,37 a	6,07 a	12,90
Grapollo	5,57 b	6,45 a	6,61 a	12,02
Grapollo 575	6,52 a	5,79 a	6,43 a	12,31
Mission	5,92 b	5,73 a	6,31 a	11,65
Koroneiki	5,97 b	6,88 a	5,87 a	12,85
Coeficiente de variação (CV%)	7,69	11,66	15,14	

Fonte: Autores (2019)

Em que: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5 % de significância.

De forma geral, na análise dos dados foi observado efeito das cultivares no número de isolados para os meios de cultura JNFb e NFb (Tabela 2). Isso pode ser explicado, principalmente, pela maior especificidade que o meio de cultura LGI

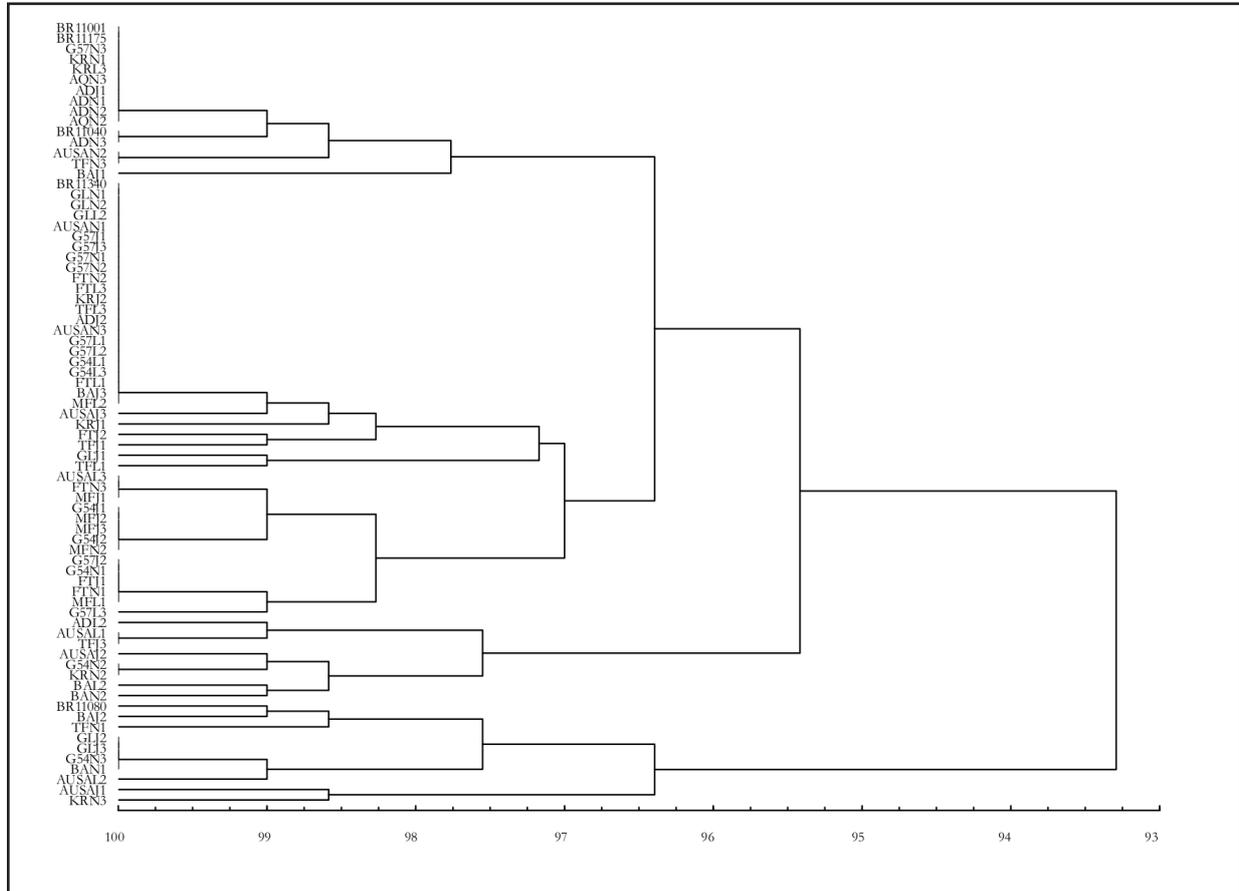
apresenta e por ser indicado apenas para isolamento e quantificação de rizobactérias da espécie *A. amazonense*, diferente dos demais meios que são capazes de quantificar outras espécies ao mesmo tempo.

Baldani *et al.* (1999) destacaram a menor especificidade que o meio JNFb apresenta, já que esse meio permite o crescimento de outras rizobactérias do gênero *Azospirillum*. Da mesma forma, Magalhães e Döbereiner (1984) mostraram que mesmo o meio NFb favoreça o desenvolvimento das espécies de *Azospirillum* outros microrganismos diazotróficos também podem crescer nestes meios, o que pode ser a justificativa para o ocorrido no presente estudo, ou seja, uma maior probabilidade de isolamento de outras bactérias.

Após a análise do NMP das RPCP nas diferentes rizosferas das oliveiras, foram obtidos, na etapa de isolamento, 70 isolados de rizobactérias, os quais foram caracterizados com base nos aspectos descritos na Tabela 1. De forma geral, foi registrada alta homogeneidade fenotípica, independentemente do meio de cultura utilizado, apresentando similaridade de 93 a 100% (Figura 1). Porém, mesmo com a alta homogeneidade apresentada, os fenótipos utilizados para caracterização foram suficientes para diferenciar os isolados obtidos nos respectivos meios de cultura, importante nos ensaios posteriores de quantificação de AIA por grupo. As características fenotípicas mais observadas nos isolados obtidos nos diferentes meios foram consistência pegajosa, coloração branca e diâmetros entre 1 e 3 mm.

Ao avaliar a densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação, Melloni *et al.* (2004) registraram maior número de isolados no meio JNFb, porém, foi indicada que estes não mostravam maior similaridade à *Herbaspirillum*. No caso em questão, as maiores médias do número de bactérias foram encontradas no meio de cultura JNFb e, na análise de similaridade, mesmo com a alta homogeneidade, nem todos foram semelhantes à estirpe-tipo *Herbaspirillum seropedicae*.

Figura 1 – Dendrograma de similaridade construído com base nas características fenotípicas culturais de cor, consistência e diâmetro de colônias



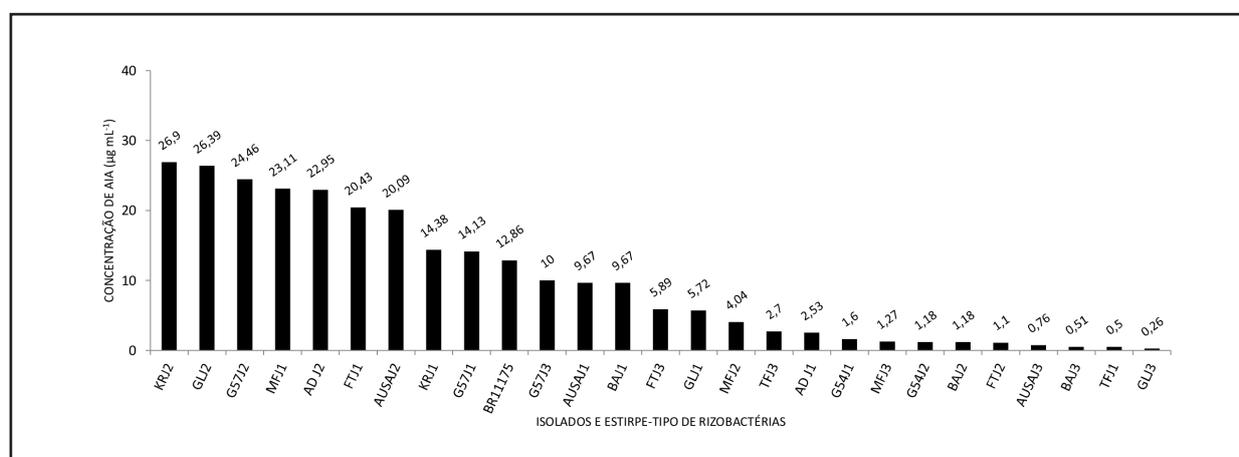
Fonte: Autores (2019)

Em que: Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Azospirillum amazonense* (BR11040T), *Burkholderia brasiliense* (BR11340T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11075T), *Azospirillum lipoferum* (BR11080T). Galega (GAL), Negrao (NEG), Grapollo 541 (GRA 541), Barnea (BAR), Leccino (LECC), Alto d'ouro (ALT), Frantoio (FRA), Tafahi (TAF), Maria da Fé (MDF), Arbequina (ARBE), Ascolano 315 (ASC 315), Arbosana (ARBO), Ascolano USA (ACS USA), Grapollo (GRA), Grapollo 575 (GRA 575), Mission (MISS), Koroneiki (KOR).

Após a caracterização, na avaliação da produção de AIA por parte dos isolados, as concentrações produzidas variaram de 0,16 a 29,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alguns isolados obtidos no meio JNFb (Figura 2) quando comparados com os obtidos nos demais meios NFb e LGI (Figuras 3 e 4, respectivamente) apresentaram maior concentração de AIA. Pode-se considerar relevantes as concentrações obtidas por parte de alguns isolados, já que,

no presente estudo, não foi utilizada a adição de triptofano. O triptofano é considerado o precursor de AIA, pois sua adição em meios de cultura promove aumento da síntese. Entretanto, existem vias independentes de triptofano para a produção de AIA (KUSS *et al.*, 2007).

Figura 2 – Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura JNFb

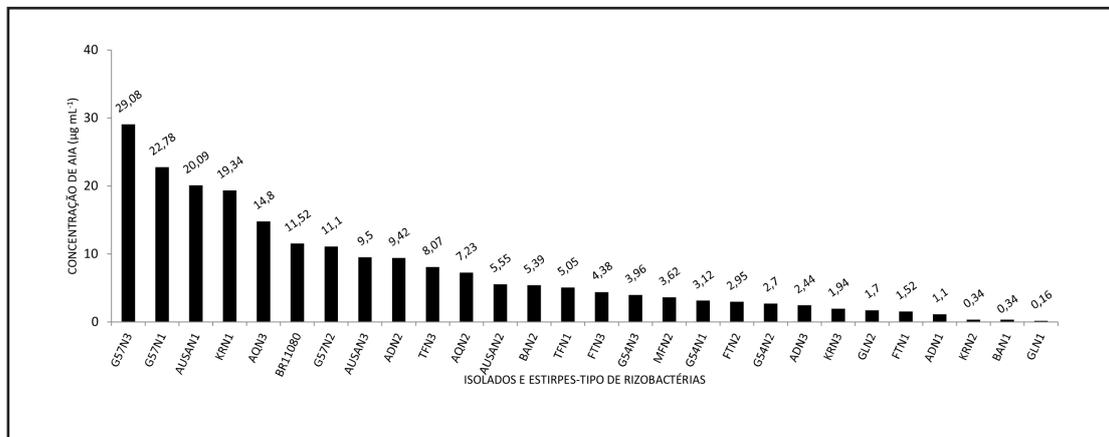


Fonte: Autores (2019)

Em que: Galega (GAL), Negrao (NEG), Grapollo 541 (GRA 541), Barnea (BAR), Leccino (LECC), Alto d'ouro (ALT), Frantoio (FRA), Tafahi (TAF), Maria da Fé (MDF), Arbequina (ARBE), Ascolano 315 (ASC 315), Arbosana (ARBO), Ascolano USA (ACS USA), Grapollo (GRA), Grapollo 575 (GRA 575), Mission (MISS), Koroneiki (KOR).

A maioria dos trabalhos relacionados à produção de AIA envolve a adição de triptofano ao meio de cultura, contudo, como citado anteriormente, existem vias independentes de produção. Especificamente, em estudos como de Mariosa *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2017), nos quais este trabalho foi baseado, não houve sua adição ao meio de cultura e os isolados de rizobactérias continuaram produzindo AIA. Por essa razão, optou-se pela não utilização.

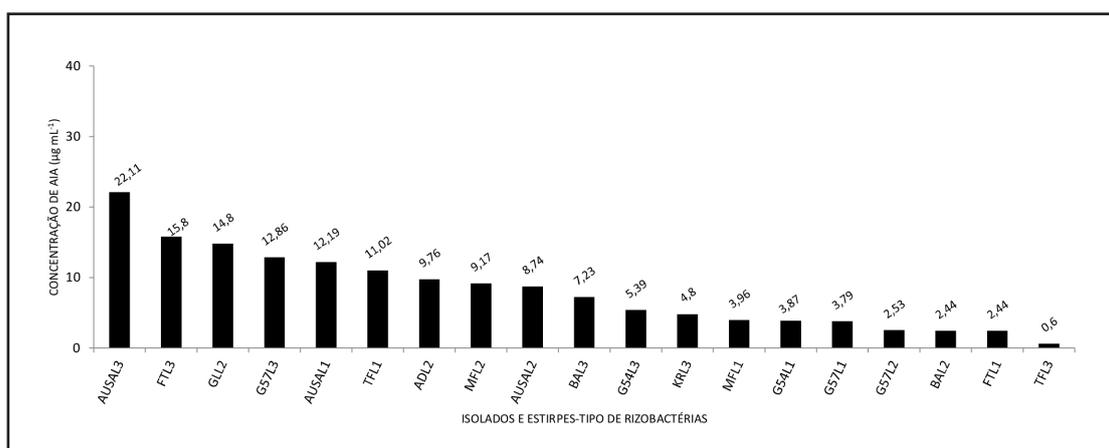
Figura 3 – Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura NFb



Fonte: Autores (2019)

Em que: Galega (GAL), Negrao (NEG), Grapollo 541(GRA 541), Barnea (BAR), Leccino (LECC), Alto d'ouro (ALT), Frantoio (FRA), Tafahi (TAF), Maria da Fé (MDF), Arbequina (ARBE), Ascolano 315 (ASC 315), Arbosana (ARBO), Ascolano USA (ACS USA), Grapollo (GRA), Grapollo 575 (GRA 575), Mission (MISS), Koroneiki (KOR).

Figura 4 – Concentração de AIA produzido, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelas estirpes-tipo e isolados obtidos pelo meio de cultura LGI



Fonte: Autores (2019)

Em que: Galega (GAL), Negrao (NEG), Grapollo 541(GRA 541), Barnea (BAR), Leccino (LECC), Alto d'ouro (ALT), Frantoio (FRA), Tafahi (TAF), Maria da Fé (MDF), Arbequina (ARBE), Ascolano 315 (ASC 315), Arbosana (ARBO), Ascolano USA (ACS USA), Grapollo (GRA), Grapollo 575 (GRA 575), Mission (MISS), Koroneiki (KOR).

O estudo realizado por de Kuss *et al.* (2007) é outro exemplo em que não houve adição de triptofano. Com o objetivo de isolar e quantificar bactérias diazotróficas associadas a raízes de diferentes variedades de arroz irrigado, e avaliar a produção de AIA e o potencial de FBN destas bactérias, os autores registraram uma produção entre 2,79 e 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em Chaves *et al.* (2015), o mesmo foi avaliado na ausência de triptofano, obtendo-se uma média de produção pelas cinco estirpes estudadas de 6,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ao comparar os resultados obtidos pelos autores citados, é possível verificar que são inferiores aos do presente estudo, sendo assim um indicativo de que, mesmo optando pela não utilização do triptofano, houve uma produção de AIA pelos isolados considerada alta.

Outro exemplo e que permite considerar a boa produção por parte dos isolados obtidos no presente estudo, é a comparação com estudos nos quais houve adição de triptofano e, ainda assim, apresentaram produção semelhante. Como no estudo de Montero-Calasanz *et al.* (2013), com objetivo de avaliar a eficiência de enraizamento em estacas de oliveira de Arbequina, Hojiblanca e Picual pela inoculação de diferentes bactérias selecionadas através de suas características fisiológicas como promotoras de crescimento. Nesse caso, foram registradas produções de AIA entre 7,6 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pela rizobactéria *A. brasilense* Cd ATCC 29729.

Florentino *et al.* (2017), ao avaliarem a produção *in vitro* de AIA por bactérias diazotróficas cultivadas na presença ou ausência do triptofano e o efeito da sua inoculação em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), observaram que a UNIFENAS 100-153 foi a maior produtora de AIA, independentemente da presença de triptofano, indicando maior versatilidade metabólica. A produção por parte dos outros isolados variou de 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, obtidos nos estudos citados e no presente estudo, estão

em conformidade com os apresentados por outros autores, os quais observaram alta variação na capacidade de produção deste fitormônio pelas estirpes bacterianas (CHAVES *et al.*, 2015). Cassán, Vanderleyden e Spaepen (2014) apontam que a produção de AIA é capaz de variar de 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em condições de cultivo, de acordo com meio de cultivo e da estirpe testada.

Sendo assim, com base na produção de AIA pelos isolados, principalmente aos que apresentaram produção acima de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os mesmos podem ser considerados viáveis para utilização em ensaios de indução de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira. Especificamente, os isolados KRJ2, GLJ2, G57J2, MFJ1, ADJ2, G57N1, AUSAL3, FTJ1, AUSAN1, AUSAJ2 e KRN1 apresentam potencial de utilização como inoculantes no enraizamento de estacas de oliveira durante a produção de mudas.

4 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que as cultivares de oliveira influenciam, diferentemente, o número de bactérias e as diferenças na caracterização fenotípica observada, apesar da alta similaridade entre si.

Os isolados apresentam produção de AIA satisfatória quando comparada com outros estudos, mesmo na ausência de triptofano, com destaque para aqueles obtidos no meio JNFb, independentemente das cultivares de oliveira. Pela produção superior a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, 11 deles (KRJ2, GLJ2, G57J2, MFJ1, ADJ2, G57N1, AUSAL3, FTJ1, AUSAN1, AUSAJ2, KRN1) apresentam potencial de utilização na indução de enraizamento de estacas de oliveira.

AGRADECIMENTOS

À Capes e Fapemig, pelo apoio financeiro. À Epamig, pela infraestrutura para realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. *In*: SIQUEIRA, J.O. *et al.* (ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS; UFLA; DCS, 1999. p. 621-666.
- CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, Cidade do México, v. 48, n. 2, p. 154-161, 2006.
- CANELLAS, L. P. *et al.* 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.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.
- 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.
- CHAVES, V. A. *et al.* Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 39, p. 1595-1602, 2015.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa; CNPAB, 1995. 60 p.
- ERTURK, Y. *et al.* 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.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FLORENTINO, L. A. *et al.* Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista colombiana de Ciências Hortícolas**, Tunja, v. 11, n. 1, p. 89-96, 2017.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 542 p.
- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. **Brasil**: olive oil imports. [S. l.]: Market Newsletter, 2018. 6 p.

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.

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.

MARIOSIA, T. N. *et al.* 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.

MELLONI, R. *et al.* Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, p. 85-93, 2004.

MONTERO-CALASANZ, M. C. *et al.* 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.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 337-344, 2010.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopatológica**, São Paulo, v. 12, p. 16, 1986.

SANTOS, F. F. *et al.* 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, 2015a.

SANTOS, R. D. *et al.* **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 7. ed. rev e ampl. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência de Solo, 2015b.

SILVA, L. F. O. *et al.* Caracterização agrônômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012a.

SILVA, L. F. O. *et al.* Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p. 488-492, 2012b.

SILVA, L. F. O. *et al.* Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012c.

SILVA, T. F. *et al.* 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.

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

VALÉ, M. *et al.* 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.

VEJAN, P. *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

Contribuição de Autoria

1 – Polianna de Paula Ramos

Bióloga, Ma., Pesquisadora Autônoma

<https://orcid.org/0000-0002-3285-6749> • polianna.pr@hotmail.com

Contribuição: Investigação, Metodologia, Visualização de dados, Escrita – primeira redação

2 – Rogerio Melloni

Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor

<https://orcid.org/0000-0002-2724-2603> • rmelloni@unifei.edu.br

Contribuição: Conceituação, Análise Formal, Obtenção de financiamento, Recursos, Supervisão, Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição

3 – Nara Luiza Pedrezzini Silva

Graduanda em Engenharia Ambiental

<https://orcid.org/0000-0001-9983-2760> • naralpedrezzini@gmail.com

Contribuição: Investigação, Metodologia

4 – Eliane Guimarães Pereira Melloni

Engenheira Agrônoma, Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0001-7183-7404> • elianegp@unifei.edu.br

Contribuição: Conceituação, Escrita – revisão e edição

5 – Gustavo Magno dos Reis Ferreira

Biólogo, Dr., Pesquisador Autônomo

<https://orcid.org/0000-0002-2232-241X> • gustavo_mrf@yahoo.com.br

Contribuição: Análise Formal, Supervisão, escrita – revisão e edição

6 – Luiz Fernando de Oliveira da Silva

Engenheiro agrônomo, Dr., Pesquisador

<https://orcid.org/0000-0002-4250-3621> • luizfernando.agronomia@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Recursos, Validação

7 - Thais Aparecida Costa da Silva

Gestora ambiental, Ma., Professora

<https://orcid.org/0000-0002-3470-8459> • thaiscostaga@gmail.com

Contribuição: Investigação, Escrita – revisão e edição

Como citar este artigo

Ramos, P. P.; Melloni, R.; Silva, N. L. P.; Melloni, E. G. P.; Ferreira, G. M. R.; Silva, L. F. O.; Silva, T. A. C. Isolamento, caracterização de rizobactérias e análise da produção de ácido indolacético visando ao enraizamento de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.). *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 1612-1630, 2021. DOI 10.5902/1980509838041. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509838041>.