



JULIA DE ALMEIDA ANTUNES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O ENRAIZAMENTO DE  
ESTACAS DE VIDEIRA**

**LAVRAS**

**2022**

JULIA DE ALMEIDA ANTUNES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE  
VIDEIRA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para obtenção do título de Bacharel.

Prof. Jorge Teodoro de Souza

Orientador

Dr. Valter Cruz Magalhães

Coorientador

LAVRAS

2022

## RESUMO

A principal forma de propagação de videiras é o uso de estacas e mudas enxertadas, enraizadas a partir de reguladores de crescimento sintéticos. Porém, os hormônios sintéticos utilizados podem prejudicar a organização celular, prejudicando o enraizamento, e ainda são tóxicos para os mamíferos. O uso de microrganismos promotores de crescimento tem se mostrado mais seguros para utilização e apresentaram resultados positivos no enraizamento de estacas, no alto índice de pegamento, e no controle de pragas e doenças. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos no enraizamento de estacas de videira a partir de microrganismos isolados da rizosfera de videiras. As bactérias foram isoladas de amostras de solo rizosférico de videiras Syrah e Bocaina da estação experimental da EPAMIG em Caldas – MG, por meio da técnica de diluição seriada. Os isolados foram cultivados em meio de cultura AN (ágar-nutriente) e posteriormente preservados em glicerol 40% a -20°C. Foram aplicadas suspensões bacterianas a  $1 \times 10^8$ . Estacas de porta-enxerto de videira permaneceram mergulhadas 24h em suspensões bacterianas ( $1 \times 10^8$  UFC) de cada isolado bacteriano, e posteriormente, foram transferidas para copos plásticos contendo substrato até enraizarem. O controle positivo foi tratado com o hormônio vegetal ANA (ácido 1-naftaleno-acético), e o controle negativo com água destilada autoclavada. Os isolados BO05, SY30, SY18, e SY04 apresentaram percentual de enraizamento de 100%, valor acima do percentual de enraizamento com o hormônio. Essas mesmas bactérias também atingiram ótimos valores de peso de massa seca da parte aérea e peso de massa seca de raiz, sendo eles respectivamente, 3,425g e 3,18g do BO05 para o primeiro screening e 0,80g e 0,45g do BO05 no experimento final, 2,19g e 1,86g do SY30, 0,67g e 0,57g SY18, e 0,64g e 0,55g do SY04. Os isolados BO05 e SY30 foram analisados superficialmente sobre Microscopia Eletrônica de Varredura e foram descritos sendo morfológicamente diferentes, embora ambos sejam do tipo bastonetes. BO05 era menor em comprimento, mais turgido e com aspecto aveludado, enquanto que SY30 possuía bastonete maior e a superfície rugosa e levemente deformada. Apesar das diferenças, ambas podem ser do gênero *Bacillus*.

**Palavras-chave:** *Vitis vinífera* L.; *Bacillus* spp.; enraizamento.

## ABSTRACT

The main method of propagating grapevines is through the use of cuttings and grafted seedlings, rooted from synthetic growth regulators. However, the synthetic hormones used can disrupt cellular organization, affecting root formation, and they are also toxic to mammals. The use of growth-promoting microorganisms has proven to be safer for application and has shown positive results in rooting cuttings, achieving a high rate of success, and controlling pests and diseases. The objective of this study is to evaluate the effects on grapevine cutting rooting using microorganisms isolated from vines rhizosphere. Bacteria were isolated from rhizospheric soil samples of Syrah and Boccaina grapevines from the EPAMIG experimental station in Caldas – MG, using the serial dilution technique. The isolates were cultured in AN medium (nutrient agar) and subsequently preserved in 40% glycerol at -20°C. Bacterial suspensions at  $1 \times 10^8$  CFU were applied. Grapevine rootstock cuttings were soaked for 24 hours in bacterial suspensions ( $1 \times 10^8$  CFU) of each bacterial isolate and then transferred to plastic cups containing substrate until rooting occurred. The positive control was treated with the plant hormone NAA (1-naphthaleneacetic acid), and the negative control with autoclaved distilled water. The isolates BO05, SY30, SY18, and SY04 showed a rooting percentage of 100%, a value higher than the rooting percentage with the hormone. These same bacteria also achieved excellent values for shoot dry weight and root dry weight, namely 3.425g and 3.18g for BO05 in the initial screening, and 0.80g and 0.45g for BO05 in the final experiment, 2.19g and 1.86g for SY30, 0.67g and 0.57g for SY18, and 0.64g and 0.55g for SY04. The isolates BO05 and SY30 were superficially analyzed using Scanning Electron Microscopy and were described as morphologically distinct, although both belonged to the rod-shaped type. BO05 was shorter in length, more turgid, and had a velvety appearance, while SY30 had a larger rod shape with a rough and slightly deformed surface. Despite the differences, both may belong to the *Bacillus* genus.

Keywords: *Vitis vinifera* L.; *Bacillus* spp.; rooting.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que têm me acompanhado e me dado forças desde de meu primeiro dia de caminhada, me apresentando quem preciso conhecer pra seguir em frente.

A minha mãe, Dayse Fernandes, que me ensinou a sempre correr atrás dos meus sonhos e a não me chatear quando algo sai do controle, sempre procurando uma solução.

Ao meu pai, Samuel Antunes, que nunca me deixou desanimar por algum obstáculo, e me apoiou incondicionalmente em todo trajeto que tenho percorrido.

Ao Prof. Jorge Teodoro de Souza, que me acolheu em seu departamento e não mediu esforços para me ajudar com o que precisasse.

Ao Dr. Valter Cruz Magalhães, que mesmo após várias dificuldades fez tudo o que estava em seu alcance para me ajudar, na vida profissional e na vida privada.

Ao Brunno Cassiano Lemos Araújo, que me permitiu acompanhar o projeto que deu origem a esse trabalho, e me ajudou com as informações que precisava.

Ao laboratório de Fitopatologia Molecular, que me forneceu todo o material necessário pra confecção deste trabalho e me apresentou pessoas incríveis que levarei para a vida.

A Universidade Federal de Lavras, quem tem sido meu segundo lar, e onde aprendi tudo o que preciso pra ser uma boa profissional.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. REFERÊNCIAL .....</b>	<b>8</b>
<u>2.1. Produção de mudas de videira.....</u>	<u>8</u>
<u>2.2. Microrganismos promotores de crescimento .....</u>	<u>9</u>
<u>2.3. Bactérias utilizadas para enraizamento.....</u>	<u>10</u>
<u>2.4. <i>Bacillus</i> spp. como promotores de enraizamento em plantas .....</u>	<u>11</u>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<u>3.1. Objetivo Geral.....</u>	<u>13</u>
<u>3.2. Objetivos específicos.....</u>	<u>13</u>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<u>4.1. Microrganismos e condições de cultivo Coleta dos Microrganismos.....</u>	<u>13</u>
<u>4.2. Isolamento das Bactérias do Solo .....</u>	<u>13</u>
<u>4.3. Preservação dos microrganismos isolados .....</u>	<u>14</u>
<u>4.4. Obtenção de suspensões bacterianas .....</u>	<u>14</u>
<u>4.5. Experimento de seleção das bactérias .....</u>	<u>14</u>
<u>4.6. Análises estatísticas .....</u>	<u>15</u>
<u>4.7. Eletromicrografia dos isolados.....</u>	<u>15</u>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>17</b>
<u>5.1. Enraizamento das estacas .....</u>	<u>17</u>
<u>5.2. Peso de Massa seca da raiz e da parte aérea .....</u>	<u>19</u>
<u>5.3. Morfologia dos isolados .....</u>	<u>24</u>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de aquisição de mudas de videira pode ser feito por dois procedimentos, a estaquia e a enxertia, que proporcionam bons resultados em campo após o plantio. Entretanto, para a garantia desses resultados, toda a etapa de produção deve ser feita com rigoroso cuidado afim de manter a qualidade por toda a cadeia produtiva. Seguindo o protocolo da EMBRAPA (2010) Para realização das mudas, deve-se primeiro coletar as estacas de enxerto e porta enxerto que foram retiradas de plantas matrizes em propagadas em viveiros, tomando o cuidado para que ambas tenham o diâmetro semelhantes e que as estacas coletadas sejam bem lignificadas.

O método da enxertia é seguindo o modelo proposto por Regina et al (2012), em que se armazena os enxertos por 30 dias em câmara fria a 3°C antes de realizar o procedimento. Normalmente se usa a garfagem, e depois de prontas o material é parafinado e envolvido em faixas para serem armazenados em câmaras aquecidas para auxiliar na cicatrização dos calos. Esses materiais são então chamados de mudas e podem ser selecionadas para serem plantadas em campo. Espera-se então, que as mudas sejam capazes de enraizar para garantir sua sustentação em campo e aquisição de água e nutrientes necessários. Porém, mudas de videira possuem baixo percentual de enraizamento, sendo necessário o uso de hormônios sintéticos para estimular a emissão de raízes. Mesmo com esse tratamento, o enraizamento das mudas em campo limita-se a apenas 50%.

É muito comum a utilização de hormônios sintéticos, como o ácido indol-3-butírico (AIB), ou o ácido 1-naftalenoacético (ANA), para promover o enraizamento das estacas colhidas ou mudas produzidas. Entretanto, por serem produtos sintéticos, doses erradas podem resultar em toxicidade ou causar o efeito contrário nas plantas, prejudicando o enraizamento (SINGH; CHEEK; HAIGLER, 2009). Dessa forma, nos últimos anos têm crescido o número de estudos envolvendo a utilização de microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP), que além de estimularem o enraizamento a partir da síntese de hormônio, são capazes de disponibilizar nutrientes inorgânicos para as plantas e controlar pragas e doenças (ABHILASH et al., 2016).

Foram isoladas bactérias diretamente do solo rizosférico de plantas de videiras da região de Caldas, MG, na Estação Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais). Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados bacterianos no enraizamento e promoção de crescimento de mudas de videira, a fim de buscar alternativas aos reguladores de crescimento sintéticos utilizados na cultura.

## 2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1. Produção de mudas de videira

A estaquia e a enxertia são dois processos utilizados para a aquisição de mudas de videira. São as mais utilizadas e costumam proporcionar bons resultados em campo após implementação. Entretanto, é necessário cuidados desde a implantação das matrizes em campo, até a aquisição das estacas que serão utilizadas para a propagação.

De acordo com o protocolo descrito pela EMBRAPA (2010), a primeira etapa para a produção de mudas de videira é a seleção dos ramos para obtenção das estacas. As estacas de porta enxerto devem ser lignificadas, entre 8 e 12 mm de diâmetro e 1,20 cm de comprimento, deve ser cortado da porção intermediária da matriz e conter de 12 a 15 gemas. As estacas do enxerto são coletadas durante a poda de produção ou a fase de repouso vegetativo, escolhendo aquelas cujo diâmetro se assemelha com os diâmetros do porta enxerto.

O material coletado é amarrado em feixes e transportados para o viveiro. Pode-se, então, alocar os ramos em reservatórios com água até 20cm de altura por oito dias, ou que seja realizado a parafinação das extremidades das estacas, e alocadas em câmaras frias com temperaturas entre 2 e 5 °C e umidade relativa entre 90 e 95%. Caso seja necessário sair da área de produção de mudas, os segmentos devem ser armazenados em caixas de isopor para transporte.

A propagação do porta enxerto é realizada a partir de estacas no campo definitivo. O enraizamento pode ocorrer também em tubetes antes de ser transportado para o viveiro, permitindo maior praticidade no manejo dos tratos culturais ocupa menor volume durante o transporte. O maior pegamento das estacas ocorre em segmentos mais lignificados, devido ao acúmulo de substâncias de reserva armazenadas nos ramos. Já a propagação da cultivar copa é feita a partir da enxertia de garfagem de fenda cheia. O garfo deve ter diâmetro semelhante ao porta enxerto, para garantir contato entre os câmbios e favorecer a cicatrização, indicando sucesso no procedimento. Após cicatrização, as novas mudas são levadas ao campo para propagação da copa.

A produção das mudas enxertadas pode ser em viveiro, denominada enxertia de mesa, ou diretamente em porta-enxertos já enraizados em campo. A partir da descrição de Regina et al (2012), a enxertia de mesa envolve a armazenagem dos segmentos adquiridos em câmara fria a 3°C por pelo menos 30 dias antes de se iniciar a enxertia. Após o período, realiza-se a enxertia convencional, geralmente pelo método de garfagem simples,



e em seguida o material é parafinado e armazenado em caixas. Os ramos já enxertados são enviados para câmaras aquecidas a temperaturas controladas de até 30°C, para auxiliar na cicatrização do enxerto e formação do calo. Após 15 dias, os calos já são visíveis, e podem ser estratificados e aclimatados. Os enxertos são então selecionados, é realizada uma nova parafinação e o material obtido passa a se chamar muda, devido à união de enxerto e porta-enxerto (REGINA; SOUZA; DIAS, 2012).

Após o plantio, espera-se que essas plantas enraízem. No entanto o enraizamento é um fator limitante na cultura da videira. O bom enraizamento vai garantir que a planta possa adquirir os nutrientes necessário para o crescimento e obviamente para uma maior produção no futuro. No que diz respeito a essa questão, mudas de videira apresentam um baixo percentual de pegamento, sendo na ordem de 50%. Ainda assim, essa taxa de enraizamento é dependente da utilização de hormônios sintéticos que possam auxiliar a planta na emissão de raízes.

## **2.2. Microrganismos promotores de crescimento**

É muito comum a utilização de auxinas sintéticas para estimular o enraizamento. O mais utilizado é o ácido indol-3-butírico (AIB), encontrado naturalmente nas plantas, porém em menores concentrações. Dependendo da dose utilizada, o hormônio é capaz de promover enraizamento, favorece o estabelecimento em campo, e estimula formação de gemas e seu crescimento (SINGH, 2002). Outro regulador utilizado é o Ácido 1-naftalenoacético (ANA), utilizado para estimular enraizamento de estacas e de folhas na cultura de tecidos e apresenta melhor atividade se comparada com o hormônio vegetal AIA (ácido indolacético). Entretanto, o hormônio ANA em doses elevadas mostrou ser prejudicial, uma vez que seu residual retarda o início da formação da parede celular secundária, assim como podem suprimir a síntese de celulose que compõe a parede, reduzem a estabilidade e fluidez da membrana plasmática e enfraquecem as interações lipídicas. Esses efeitos podem acontecer mais intensamente em células vegetais, mas também são vistas em células animais (HĄC-WYDRO; FLASIŃSKI, 2015; SINGH; CHEEK; HAIGLER, 2009).

Entretanto, as recentes procuras por métodos mais sustentáveis de cultivo têm sido um estímulo à utilização de Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas (MPCP). Os MPCPs são microrganismos, em sua maioria bactérias, que sobrevivem em solo rizosférico e auxiliam as plantas ou o ambiente com diversas funções, dispensando o uso

de produtos sintéticos e evitando contaminações ambientais. Além disso, o uso de MPCP's é acessível para pequenos produtores e podem ser usados para regulação de crescimento, controle de pragas e doenças, biorremediação de solo contaminado, auxiliam na produtividade e produção de alimentos biofortificados, e promove a ciclagem de nutrientes (ABHILASH et al., 2016).

Alguns gêneros de bactérias são capazes de produzir fitormônios, que seriam encontrados naturalmente nas plantas, capazes de auxiliar diretamente no desenvolvimento vegetal. Alguns dos hormônios produzidos são citocininas, giberelinas e auxinas. As auxinas bacterianas (AIA), presentes na rizosfera, são absorvidas e estimulam a boa formação de raízes adventícias nas estacas, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, as auxinas afrouxam as células da parede celular, permitindo a liberação de mais exsudatos radiculares que servem de fonte de nutrientes para as bactérias, aumentando a atividade microbiana (GLICK, 2012; PARK et al., 2021). A produção do hormônio não é dependente da concentração de carbono existente no solo, entretanto, é necessário a presença de aminoácidos como triptofano para que a produção de auxina seja satisfatória (PARK et al., 2021).

Microrganismos também podem estar envolvidos em processos que auxiliam na disponibilização de outros compostos importantes para as plantas. Esses outros mecanismos envolvem a elevada fixação de nitrogênio, dispensando o uso de nitrogenados, e a solubilização de fósforo, que favorecem a elevada nutrição da planta e evitam a perda do nutriente, uma vez que o fósforo inorgânico presente em fertilizantes fosfatados é retido no solo antes de ser absorvido pelas plantas. Sequestro de ferro, uma vez que ambos microrganismos e plantas necessitam de alta concentração do elemento, além de ajudar as plantas a suportarem situações de estresse. Em adição, indivíduos MPCP são altamente competitivos, impossibilitando o crescimento de fitopatógenos por competição por nutrientes ou liberação de compostos antimicrobianos (GLICK, 2012).

### **2.3. Bactérias utilizadas para enraizamento**

MPCPs que promovem o enraizamento envolvem bactérias de vida livre, bactérias simbiotes com as raízes das plantas, bactérias endofíticas, e cianobactérias, todas com a mesma finalidade utilizando mecanismos diretos e indiretos. Algumas mais comuns como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., e outras, já são comercializadas mundialmente, mas não com o propósito de enraizamento, e sim para controle de pragas e doenças (GLICK, 2012).

A maioria das bactérias estão presentes na rizosfera, e são capazes de produzir auxina, como é o caso de *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, e *Rhizobium* (PARK et al., 2021). Cada gênero pode possuir mecanismos específicos que regulam esse processo.

Espécies de *Pseudomonas*, por exemplo, são capazes de sequestrar e solubilizar o fósforo do solo, e tornam esse nutriente disponível para as plantas por meio da conversão em formas absorvíveis. São capazes de produzir citocininas e giberelinas em quantidades adequadas para promover a divisão celular. E além disso, são altamente competitivas, impedindo a sobrevivência de outros gêneros de bactéria nas proximidades da rizosfera da planta.

Espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Azospirillum* são exemplos de bactérias de vida livre capazes de se associar com as raízes de plantas, e com a capacidade de fixar o nitrogênio da atmosfera, viabilizando a disponibilização de formas mais absorvíveis desse nutriente para as plantas (GLICK, 2012; PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016).

Em experimentos conduzidos por Campisano et al. (2015) com estacas de videira domesticadas e selvagens mostraram que os três gêneros mais abundantes encontrados tanto em cultivares como em variedades selvagens foram *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Bacillus*, sendo que dos isolados extraídos e avaliados, apenas *Bacillus* apresentou a atividade de promoção de crescimento. Entretanto, o experimento citado não realizou a análise de enraizamento em novas estacas de videira, e sim em sementes de *Arabidopsis thaliana*. Até o presente momento, não há estudos o suficiente sobre o uso de microrganismos promotores crescimento para avaliar o enraizamento de estacas de videira.

#### **2.4. *Bacillus* spp. como promotores de enraizamento em plantas**

O gênero *Bacillus* possui a maior variedade de mecanismos de ação e ainda serve como agente de controle biológico. Diversas espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* ou *B. megaterium* são comercializadas com o intuito de controlar pragas e doenças em campo, afim de complementar ou evitar o uso de produtos químicos. Entretanto, são poucos os relatos da utilização dessas bactérias como promotores de enraizamento (GLICK, 2012).

Isolados de *Bacillus* são eficientes em solubilizar grandes quantidades de fósforo inorgânico do solo, tornando-o disponível para as plantas. O mesmo acontece com o ferro,

uma vez que essas bactérias são capazes de produzir sideróforos. Sideróforos são moléculas capazes de solubilizar e de se ligarem ao elemento ferro, sendo possível transportá-lo para dentro das células vegetais durante a absorção (PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016). Além disso, esses microrganismos são capazes de sintetizar ACC deaminase, enzima capaz de controlar os níveis de etileno em valores baixos, permitindo a maior concentração de hormônios promotores e permitindo que a planta tenha mais resiliência a situações de estresse (TAO et al., 2015; WAGI; AHMED, 2019)

A produção de auxinas é uma característica que o gênero mais se destaca. Em condições ideais, a produção de AIA é altamente satisfatória, complementando-se com o fitormônio já produzido pela planta. Em condições de solo deficiente, quando há falta de triptofano, a produção de auxina fica levemente reduzida, mas ainda é capaz de auxiliar do enraizamento. Triptofano é um aminoácido liberado naturalmente pelos exsudatos das raízes, logo, basta a planta estar bem nutrida e o solo rico em nutrientes que este servirá de precursor do hormônio (WAGI; AHMED, 2019).

A combinação entre teores de auxina e ACC deaminase atuam de forma sinérgica nas estacas, juntamente com as outras enzimas e modos de ação. Dessa forma, permite o crescimento e desenvolvimento das raízes, mesmo em situações de estresse ambiental (WAGI; AHMED, 2019).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da aplicação de diferentes isolados bacterianos no enraizamento e promoção de crescimento em estacas de videira.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar o potencial de isolados bacterianos no enraizamento de estacas de videiras.

Avaliar o potencial de isolados bacterianos em promover o crescimento de raízes de estacas de videiras

Avaliar o potencial de isolados bacterianos em promover o crescimento da parte aérea de estacas de videira

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Microrganismos e condições de cultivo Coleta dos Microrganismos**

Foram coletadas amostras de solo rizosférico de mudas enxertadas de duas cultivares de videira, “Syrah” e “Bocaina”, da estação experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), localizada no município de Caldas, Minas Gerais. As amostras de solo foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em recipiente com gelo e levadas ao Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia, localizado na Universidade Federal de Lavras. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento de isolamento

#### **4.2. Isolamento das Bactérias do Solo**

As amostras de solo coletadas foram utilizadas para realização do isolamento de bactérias esporogênicas. O isolamento dessas bactérias foi realizado por meio da técnica de diluição seriada, conforme descrito por SILVA (2014). Foram pesados 5g de cada amostra de solo, e esse material foi mantido em estufa a 80°C durante 5h. Depois dessa etapa, 1g de solo de cada amostra foi transferido para tubos Falcon contendo 9mL de solução salina (0,85% de NaCl). Esse material foi agitado durante 1 minuto no Vortex e incubador em banho maria a 80°C por 12 minutos e posteriormente transportados para um recipiente com gelo por 5 minutos. O solo suspenso em solução salina foi novamente agitado em Vortex por 1 minuto e foram feitas diluições até a concentração  $10^{-3}$ .

Alíquotas de 100µL da suspensão foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura AN (Ágar-Nutriente). Essas alíquotas foram espalhadas nas placas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 25°C durante 24h em BOD's. Após o período de incubação, as colônias foram contabilizadas e repicadas em novas placas com meio de cultura AN. Para garantir a pureza dos isolados, foram realizadas estrias para o isolamento dos microrganismos antes mesmo da realização dos procedimentos de preservação dos mesmos.

#### **4.3. Preservação dos microrganismos isolados**

Os isolados purificados e crescidos em placas foram transferidos para Erlenmeyer's de 250mL contendo 50mL de meio de cultura líquido (Caldo de Nutrientes), contendo peptona bacteriológica e extrato de carne. Os Erlenmeyer's foram colocados em mesa agitadora orbital a 150 rpm por 24h em temperatura de 25°C±2°C. Por fim, 0,9mL da suspensão bacteriana foi armazenado em microtubos de 2mL contendo glicerol 40% e armazenados a -20°C.

#### **4.4. Obtenção de suspensões bacterianas**

Para obtenção das suspensões bacterianas, cada um dos isolados bacterianos foi reativado em placas de Petri contendo meio AN. As placas foram incubadas em BOD a 25°C durante 24-48 horas. De posse do pré-inóculo, cada isolado foi repicado para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido caldo de nutrientes. Cada erlenmeyer foi submetido à agitação contínua em mesa agitadora orbital durante 24 horas, à temperatura de 25°C±2°C. Decorrido este tempo, foi retirada uma alíquota de 1 mL, que foi transferida para microtubos de 1,5 mL, e centrifugada a 14.000 rpm por 1,5 minuto. O sobrenadante no tubo foi descartado e o pelete foi re-suspenso em 1 mL de solução salina (0,89% de NaCl) esterilizada. Cada isolado teve a determinação da sua OD600 (Densidade Ótica em 600 nanômetros) em espectrofotômetro, e as concentrações de todos os isolados foram ajustadas com solução salina (0,89 de NaCl) para um valor de OD de 0,05. As soluções foram transferidas para tubos de Falcon devidamente identificados e utilizados nos experimentos em casa de vegetação.

#### **4.5. Experimento de seleção das bactérias**

Foi utilizado o porta-enxerto IAC 572 em todos os experimentos para avaliar o efeito das bactérias no enraizamento e promoção de crescimento de mudas de videira. Os experimentos foram realizados na casa de vegetação do Laboratório de Fitopatologia

Molecular (LFM) da Universidade Federal de Lavras. No total, foram testados 32 isolados bacterianos, sendo que destes, 31 foram isolados de solo rizosférico de mudas de videiras, e um isolado (INV) foi oriundo da coleção de bactérias do Laboratório de Fitopatologia Molecular. Os isolados foram testados em dois diferentes screenings. Com base nos resultados dos screenings, foi realizado um experimento utilizando apenas os isolados que apresentaram os melhores e piores resultados. No screening 1, foram testados 26 tratamentos com 5 repetições cada, sendo que em 24 tratamentos foram utilizados diferentes isolados bacterianos, e dois tratamentos controles: controle negativo apenas com água destilada, e controle positivo com  $6\text{ml.L}^{-1}$  de hormônio de enraizamento ANA (ácido 1-naftaleno-acético). No screening 2, foram testados 12 tratamentos com 8 repetições cada, sendo 10 isolados bacterianos e dois tratamentos controles: controle negativo apenas com água destilada, e controle positivo com 0,0042% de hormônio de enraizamento ANA (ácido 1-naftaleno-acético). No experimento final, foram testados 15 isolados juntamente com os mesmos controles experimentais utilizados nos experimentos anteriores e com um total de 20 repetições por tratamento, divididos em 4 blocos de repetições para cada tratamento. Estacas de videiras da variedade IAC 572 ficaram com uma das extremidades submersas em suspensões bacterianas ( $1 \times 10^8$  UFC) por um período de 24h. Após 24h, as estacas foram acondicionadas em copos plásticos de 700mL preenchidos com a proporção de 1:1 de substrato e areia, e armazenados em casa de vegetação, onde ficaram durante 60 dias. Para avaliação, as raízes e a parte aérea das plantas foram cortadas, adicionados em sacos de papel devidamente identificados e colocados em estufa para secagem a  $70^\circ\text{C}$  por 96h. Após esse período, o material foi pesado em balança de precisão.

#### **4.6. Análises estatísticas**

Todos os conjuntos de dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Bartlett). Atendidos os pressupostos, aplicou-se o teste F por meio de análises de variância (ANOVA). Os dados de todos os experimentos foram submetidos separadamente a análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparados por teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) no Programa R (R CORE TEAM, 2019).

#### **4.7. Eletromicrografia dos isolados**

As imagens dos isolados mais promissores foram obtidas a partir de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise

Ultraestrutural (LME) localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Para obtenção das imagens, uma alçada de cada isolado foi colocada em 15 mL de meio AN líquido e agitados por 48 h a 180 rpm a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota do meio líquido foi então colocada em microtubos contendo o fixador Karnovsky, que foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Uma pequena quantidade da alíquota foi adquirida, colocada em uma lamínula circular contendo poli-L-lisina, e mantida em repouso até que a amostra secasse. Após secagem das amostras, iniciou-se a etapa de desidratação. As amostras foram embebidas com diferentes concentrações de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) para remoção de toda umidade das células durante 10 minutos cada, sendo a última concentração repetida três vezes. As amostras desidratadas foram levadas para desidratação em ponto crítico, a fim de se extrair o solvente das amostras por meio da injeção de gás carbônico em pressão pré-determinada. Assim, o solvente foi solubilizado no gás carbônico e removido em forma de gás, mantendo a integridade das células das amostras. Por fim, a lamínula é aderida a pequenos *stubs* por meio de uma fita de carbono e separados para realização do banho de ouro.

As imagens adquiridas serviram para comparação morfológica entre os isolados e observação da forma física e estruturas superficiais dos isolados.

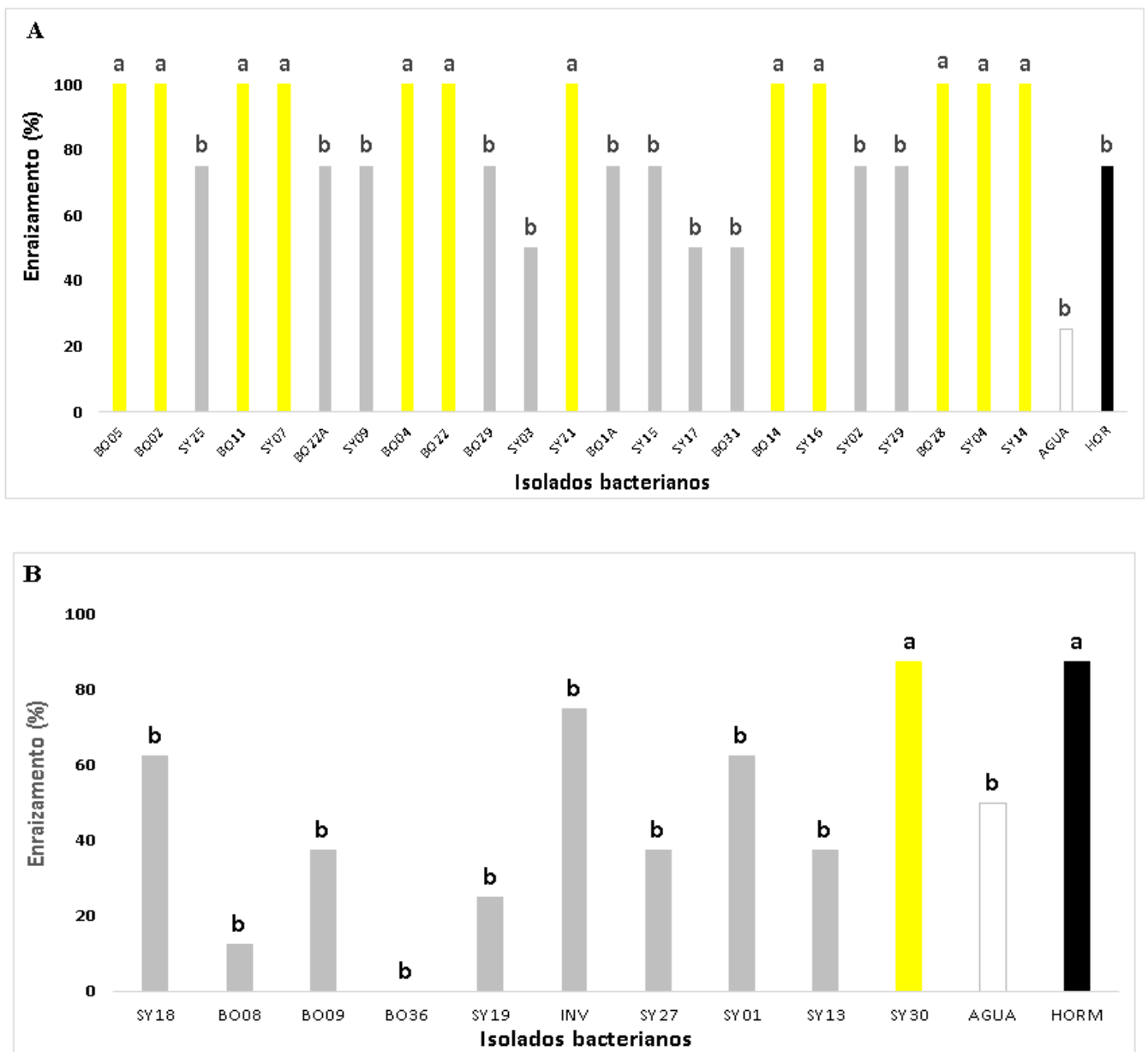


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Enraizamento das estacas

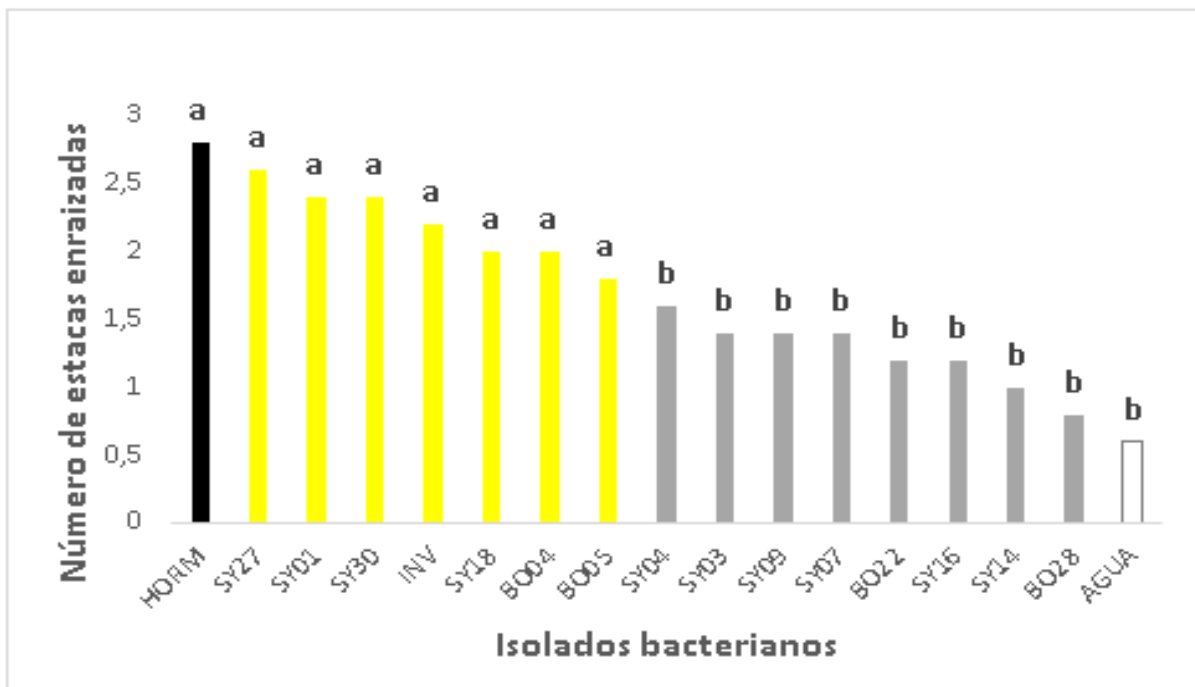
Foi avaliado o potencial de indução de enraizamento de mudas de videira inoculadas com os isolados utilizados no presente trabalho. A Figura 1 indica a porcentagem de enraizamento das mudas de videira inoculadas com os isolados testados nos primeiro e segundo screenings. Os isolados BO05, BO02, BO11, SY07, BO04, BO22, SY21, BO14, SY16, BO28, SY04 e SY14 apresentaram 100% de enraizamento. Curiosamente, esses isolados apresentaram resultados melhores que os observados para o tratamento controle, no qual é utilizado o hormônio ANA. Esses resultados são interessantes, uma vez que mostram que existem isolados capazes de ser uma alternativa mais interessante para o enraizamento de mudas de videira. Os dados obtidos entram em acordo com o experimento descrito por Park et al (2021), em que comprova a eficiência dos microrganismos promotores de crescimento no enraizamento de plantas. Esses resultados podem ser um indicativo de que essas bactérias estejam produzindo altas taxas de hormônios que auxiliam no enraizamento, incluindo auxinas. A produção de auxina é um dos mecanismos de ação de bactérias benéficas para promover o enraizamento das estacas de videira, porém a síntese pelo isolado vai depender da produção endógena desse hormônio pela planta. Assim sendo, a produção de auxina bacteriana pode ser estimulada ou inibida dependendo da concentração de AIA nas células vegetais (GLICK, 2012). O alto enraizamento das estacas a partir dos isolados vistos no experimento indica a baixa concentração do hormônio nas células, sendo necessária a síntese das auxinas bacterianas.

No segundo screening, dos isolados utilizados apenas SY30 apresentou enraizamento semelhante ao tratamento hormonal, com 87,5% de enraizamento. O isolado BO36, entretanto, apresentou 0% de enraizamento, podendo indicar falha na produção das auxinas ou que esse isolado possui a capacidade de inibir, e não estimular, a formação de raízes nas estacas.



**Figura 1.** Efeito da aplicação de isolados bacterianos no enraizamento de estacas de videira da variedade IAC 572. (A) Valores de enraizamento de estacas de videira no primeiro screening. (B) Valores de enraizamento de estacas de videira no segundo screening. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ANA. Os valores representam os dados percentuais de enraizamento de 4 repetições para cada tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ).

O experimento final (figura 2) foi realizado escolhendo os melhores e piores isolados a partir dos dois screenings. A avaliação foi feita analisando a média do número de estacas que enraizaram por bloco, em comparação com o hormônio utilizado. Os isolados SY27 (2,60), SY01 (2,40), SY30 (2,40), INV (2,20), SY18 (2,00), BO04 (2,00) e BO05 (1,80) apresentaram enraizamento semelhantes ao hormônio (2,80), entrando em concordância com os dois primeiros screenings realizados. Apesar de ser necessário mais um experimento comprovando a eficiência em campo, pode-se dizer que esses isolados têm potencial para serem utilizados em formulações agrícolas com a finalidade de promover o enraizamento de estacas de videira.



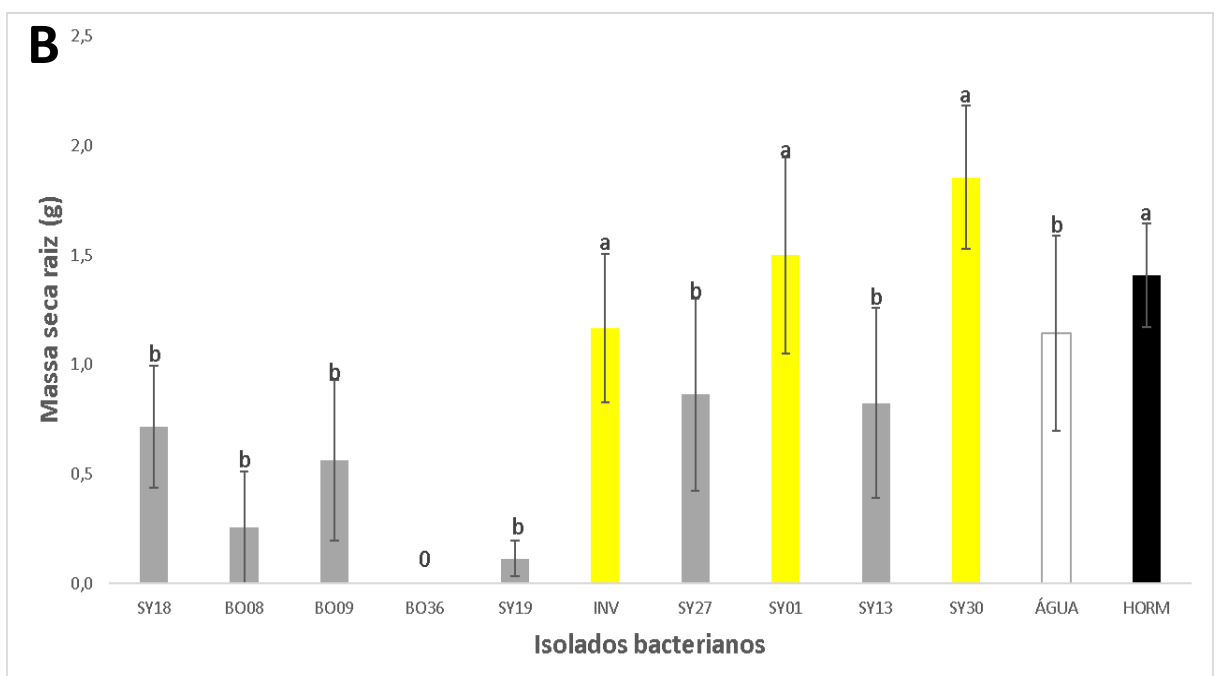
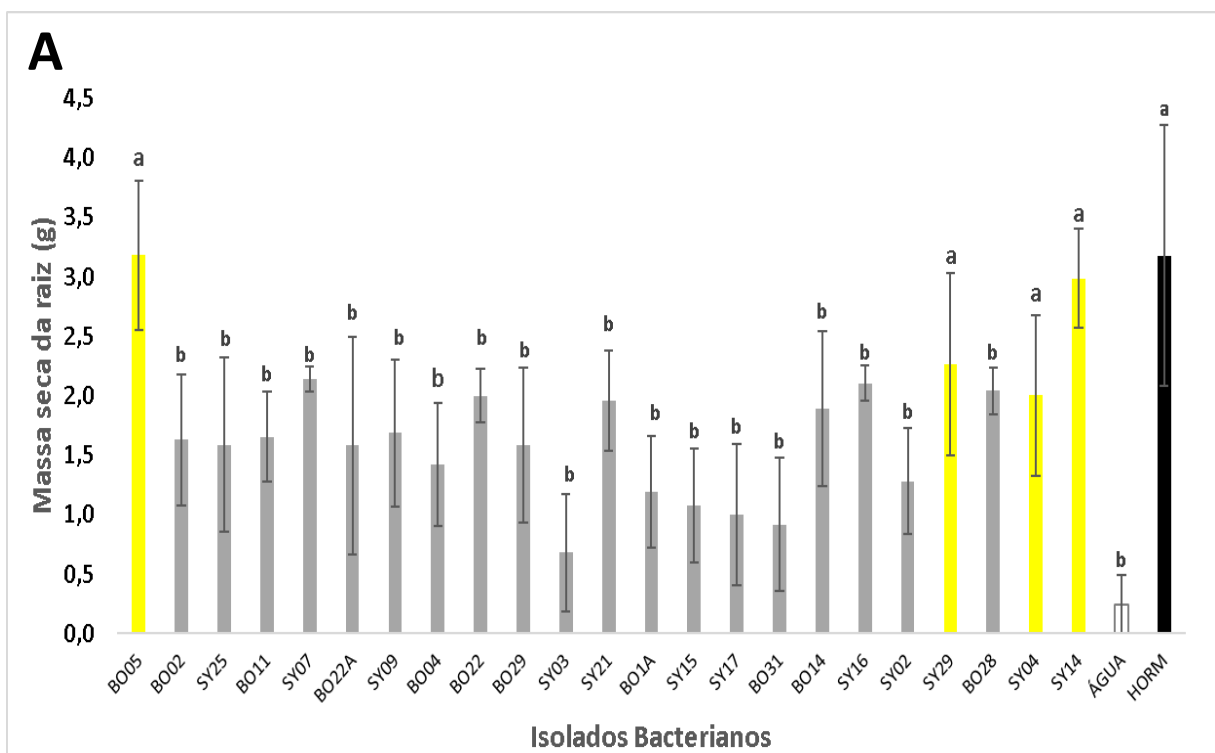
**Figura 2.** Efeito da aplicação de isolados bacterianos no enraizamento de estacas de videira da variedade IAC 572 no experimento final. Foram avaliadas 20 repetições, divididos em 4 blocos com 5 repetições cada. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ANA. Os valores representam os dados percentuais de enraizamento de 4 repetições para cada tratamento. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ).

## 5.2. Peso de Massa seca da raiz e da parte aérea

A partir dos dados do primeiro e segundo screenings, foi possível identificar aquelas bactérias que mais influenciaram no peso das raízes e massa seca de estacas de videira. No primeiro screening, a massa da raiz das plantas tratadas com hormônio foi de 3,18g, e os

isolados que obtiveram os melhores desempenhos, sendo estatisticamente iguais ao hormônio, foram BO05 (3,18g), SY14 (2,99g), SY29 (2,27g), SY04 (2,00g).

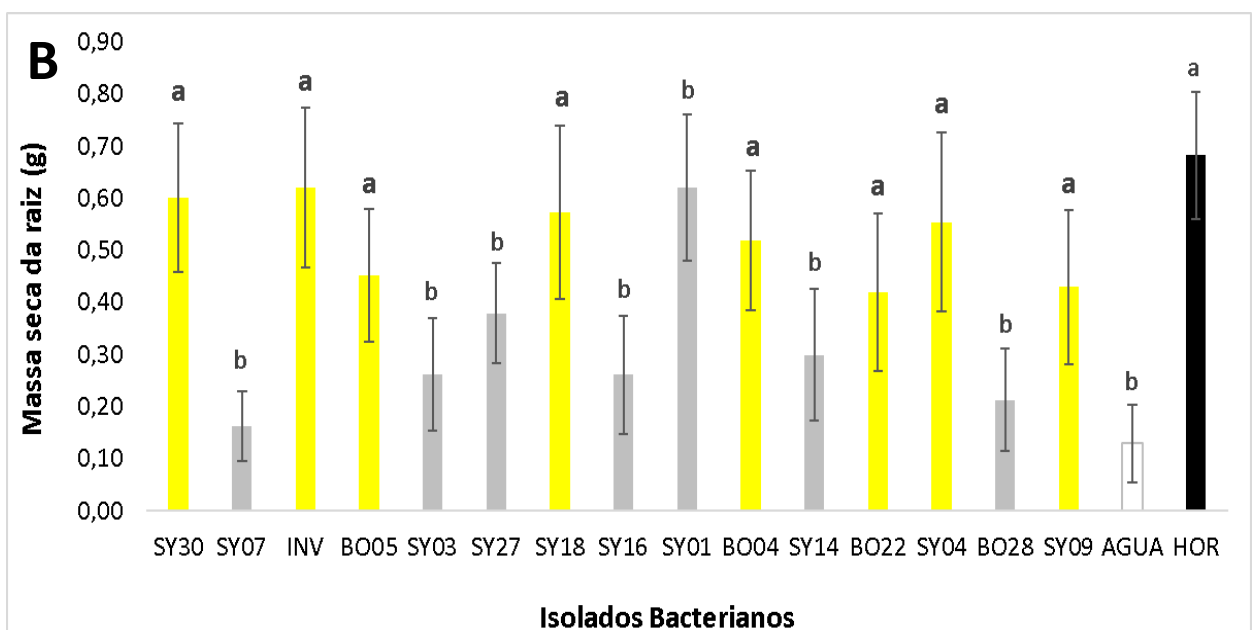
No segundo screening, também foram observadas diferenças estatísticas significativas no peso de massa seca da raiz a partir da aplicação dos isolados bacterianos testados. O valor obtido com o tratamento com hormônio ANA foi de 1,41g. Ao avaliar as raízes dos tratamentos, três dos isolados aparecem com bons resultados, sendo eles SY30 (1,86g), SY01 (1,5g) e INV (1,17g) (figura 3). Os resultados mostram que, apesar de haver outros fatores, isolados capazes de promover o enraizamento podem favorecer o melhor desenvolvimento radicular.



**Figura 3.** Efeito da promoção de crescimento de raiz de isolados bacterianos em estacas de videira da variedade IAC 572. **(A)** Valores de massa seca da raiz de estacas de videira da variedade IAC 572 no primeiro screening, valendo-se de 4 repetições. **(B)** Valores de massa seca da raiz de estacas de videira da variedade IAC 572 no segundo screening, valendo-se de 8 repetições. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ANA. Não houve diferenças estatísticas significativas nos valores de massa seca da parte aérea. Enquanto que para os valores de massa seca da raiz. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ). Em ambos os gráficos, as barras de erro representam o erro padrão das médias.

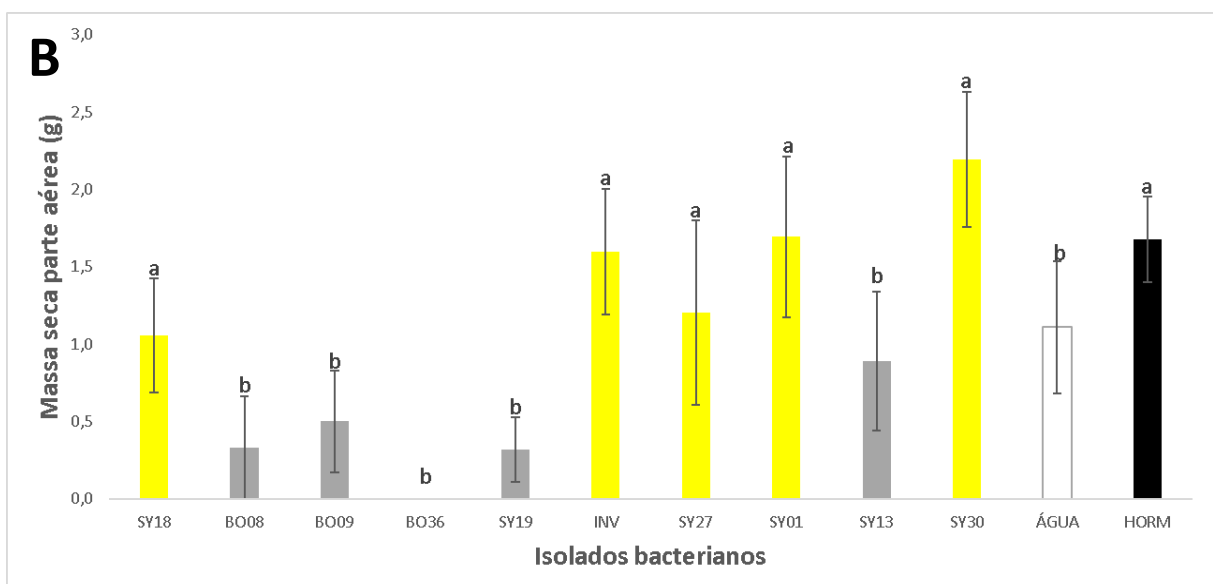
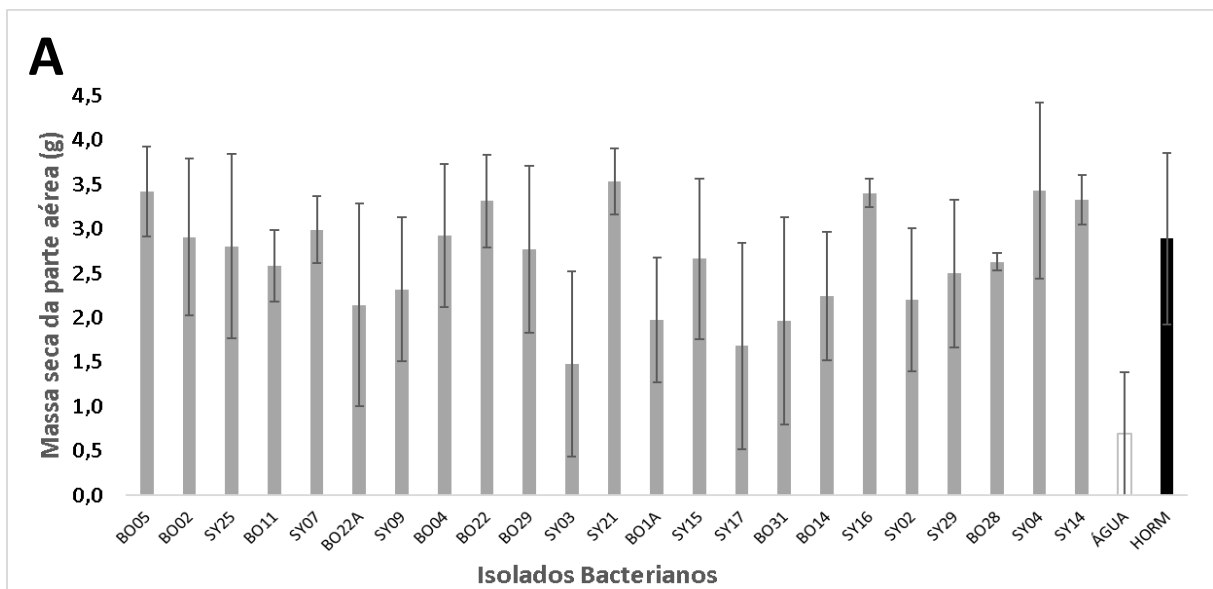
Afim de confirmar os resultados obtidos, foi realizada a análise de massa seca de raiz no experimento final. Os resultados obtidos nesse novo experimento confirmaram os achados dos screenings anteriores. Os isolados (0,62g), SY30 (0,60g), SY18 (0,57g), SY04 (0,55g), BO04 (0,52g), BO05 (0,45g), SY09 (0,43g), e BO22 (0,42g), se destacaram. Para esses resultados, as bactérias não apresentaram diferenças significativas em comparação com o tratamento controle em que se utilizou o hormônio ANA (0,68g) (Figura 4).

Já foi comprovado que a presença de microrganismos benéficos em solo rizosférico estimulam o desenvolvimento de raízes em estacas, não apenas de videiras, mas qualquer outra espécie com propagação vegetativa. Os resultados gerados, entram em concordância com experimentos feitos anteriormente, em que raízes bem desenvolvidas a partir do estímulo oferecido pelos isolados terão maior peso de massa seca, igualando-se aos resultados com o hormônio ANA (DE SOUSA et al, 2020; VERMA; CHAUHAN; CHANDEL, 2017).



**Figura 4.** Efeito da promoção de crescimento de raiz de isolados bacterianos em estacas de videira da variedade IAC 572 no experimento final. Os valores representam a média de massa seca de raiz de 20 repetições por tratamento. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ácido 1-naftalenoacético ANA. Houve diferença estatística significativa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro representam o erro padrão das médias.

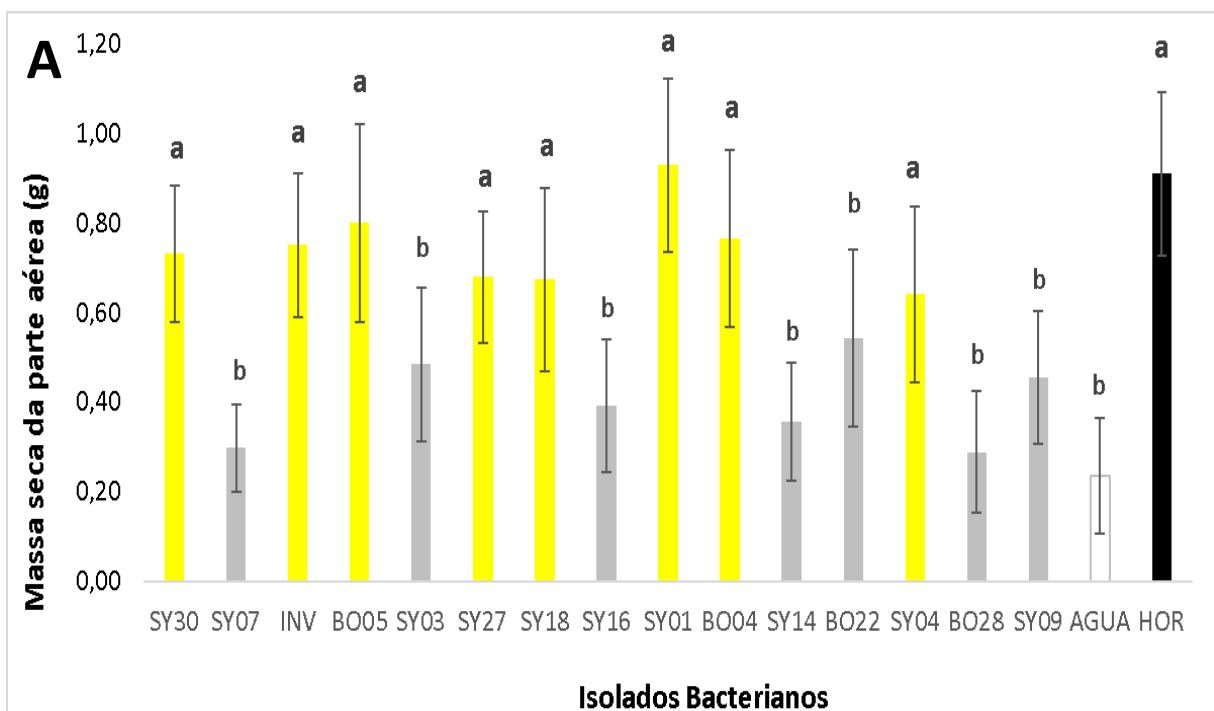
No que diz respeito a massa seca da parte aérea, embora existam diferença entre as médias dos tratamentos utilizados, no primeiro screening essas diferenças não foram significativas. Logo, a aplicação dos isolados testados não promoveram nenhum tipo de incremento de massa na parte aérea das mudas de videiras em comparação com o hormônio. No segundo screening, entretanto, essas diferenças foram identificadas, e é possível selecionar os isolados semelhantes ao hormônio (1,68g), sendo eles SY30 (2,19g), SY01 (1,69g), INV (1,60g), SY27 (1,21g) e SY18 (1,06g). O gráfico da figura 5 ilustra essas diferenças entre os screenings.



**Figura 5.** Efeito da promoção de crescimento de parte aérea de isolados bacterianos em estacas de videira da variedade IAC 572. **(A)** Valores de massa seca da parte aérea de estacas de videira da variedade IAC 572 do primeiro screening, valendo-se de 4 repetições. **(B)** Valores de massa seca da parte aérea de estacas de videira da variedade IAC 572 no segundo screening, valendo-se de 8 repetições. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ANA. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ). Em ambos os gráficos, as barras de erro representam o erro padrão das médias.

Assim como foi feito anteriormente, o peso de massa seca de parte aérea do experimento final também foi avaliado. Os isolados SY01 (0,93g), BO05 (0,80g), BO04 (0,77g), INV (0,75g), SY30 (0,73g), SY27 (0,68g), SY18 (0,67g) e SY04 (0,64g) se destacaram em promover o crescimento da parte aérea de estacas de videira, não havendo diferenças significativas em comparação com o tratamento em que se utilizou o hormônio(0,91g).

O experimento final realizado mostrou que alguns dos isolados com bons resultados na massa seca de raízes também apresentaram bons resultados para a variável peso seco da parte aérea, enquanto SY27 e SY01 só foram significativos no peso de parte aérea. A razão para isso pode ser de origem ambiental, ou mesmo por questões fisiológicas inerentes aos próprios isolados, uma vez que a composição genética desses pode ser diferente e por conta disso eles podem apresentar fenótipos de interação diferente com seus hospedeiros. É interessante destacar que os isolados que apresentaram boa performance, podem servir de base para a formulação de produtos que possam auxiliar na promoção de crescimento de estacas de videira.



**Figura 6.** Efeito da promoção de crescimento de parte aérea de isolados bacterianos em estacas de videira da variedade IAC 572 no experimento final. Os valores representam a média de massa seca de raiz de 20 repetições por tratamento. O Tratamento “ÁGUA” representa o controle negativo, enquanto que o tratamento “HORM” representa o controle positivo, no qual foi aplicado o hormônio ácido 1-naftalenoacético ANA. Houve diferença estatística significativa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro representam o erro padrão das médias.

Entretanto, para confirmar ou não a efetividade dos isolados no desenvolvimento da parte aérea, o experimento deverá ser refeito valendo-se de outra metodologia. Isso porque diferentes concentrações de hormônios ou outro promotor de crescimento não influencia no maior crescimento da parte aérea, valendo-se apenas a quantidade de reserva que a planta foi capaz de acumular. Isso foi identificado em experimentos utilizando-se culturas agrícolas diferentes e com métodos de propagação distintos (ROSA et al, 2017; LOCONSOLE et al, 2022; PEREIRA, 2018).

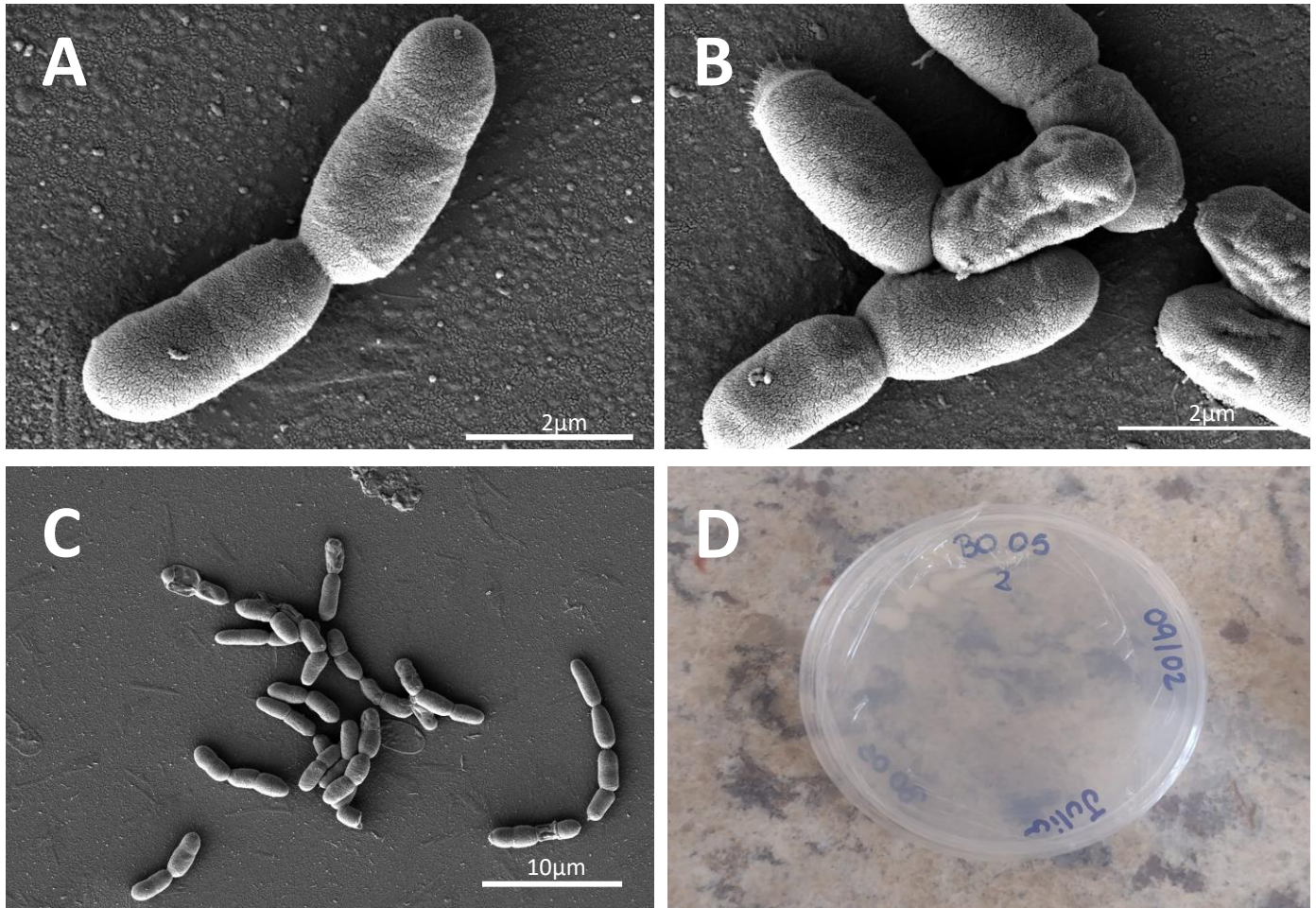
### 5.3. Morfologia dos isolados

Com o intuito de observar aspectos morfológicos dos isolados mais promissores, foram escolhidos dois isolados que apresentaram boa performance em todas as variáveis observadas ao longo do presente estudo. Foram geradas imagens em microscópio eletrônico de varredura dos isolados BO05 e SY30 (Figura 6.). Como mencionado anteriormente, esses foram os que mais se destacaram em promover o aumento de massa seca de raiz, massa seca de parte aérea, e ambos proporcionaram altas taxas de enraizamento, superando até mesmo o tratamento hormonal.

O intuito das imagens é o de comparar ambas as bactérias a nível morfológico, reconhecendo suas diferenças e semelhanças. As eletrografias obtidas por MEV são de alta resolução e nitidez, e dão informações da superfície dos isolados, sendo muito utilizada para o estudo preliminares de classificação de microrganismos, sendo possível visualizar possíveis estruturas celulares (GALETTI; 2003).

O isolado BO05 é uma bactéria do tipo bastonete, embora de aparência menor e mais turgida, sem a presença de flagelos e com aspecto superficial aveludado (Figura 7). O isolado em questão pode ser uma bactéria do gênero *Bacillus* devido à aparência morfológica descrita assim como a observação das colônias em placas de petri, que são esbranquiçadas, brilhosas de aspecto liso e uniforme.



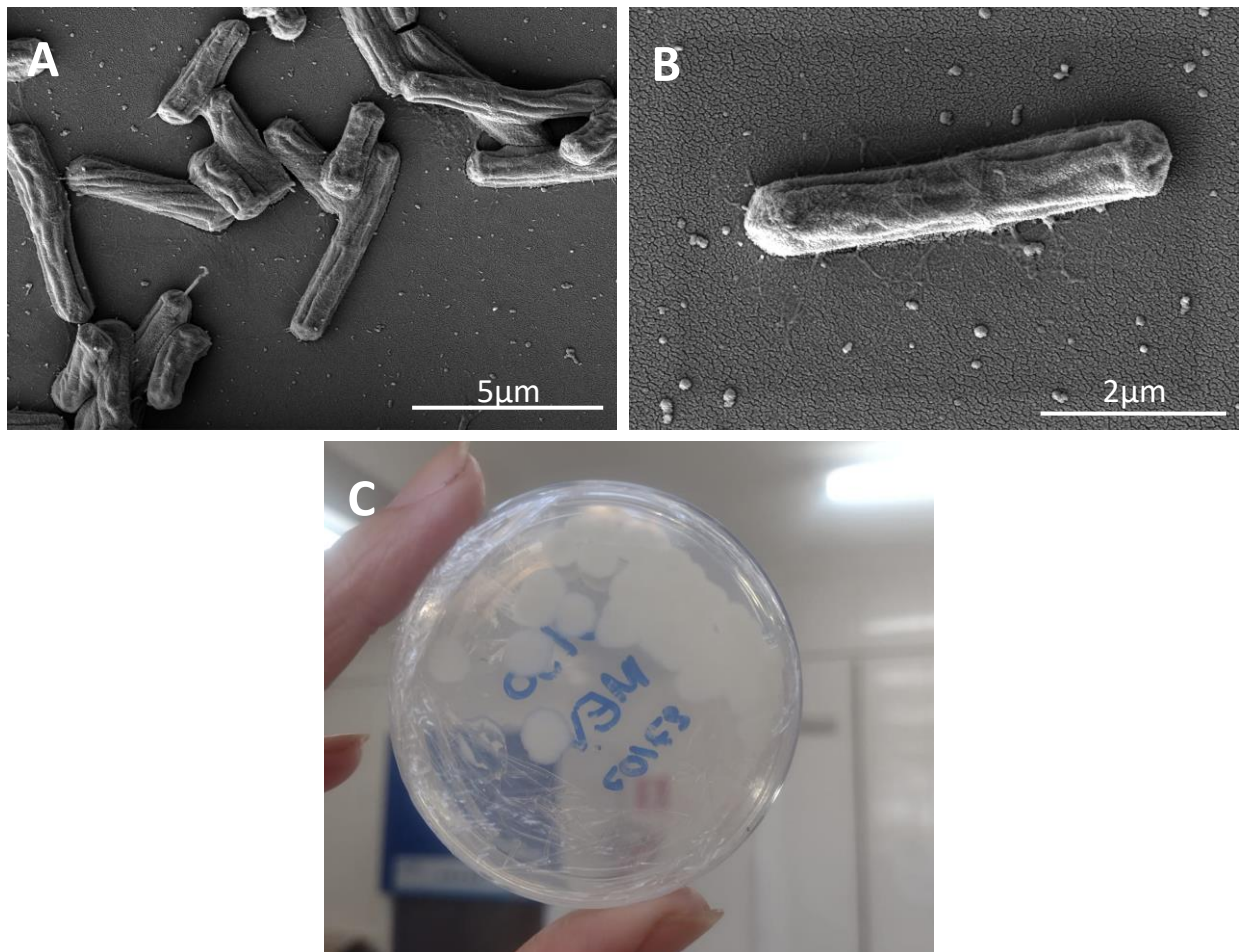


**Figura 7.** Eletromicrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura, caracterizando o isolado BO05 em grande aumento e sua colônia. (A) e (B) Imagens ampliadas do isolado mostrando suas características físicas e pequenas estruturas. (C) Pequena aglomeração do isolado, mostrando com maior nitidez a morfologia do microrganismo. (D) Placa de petri para reativação da bactéria após conservação em  $-20^{\circ}\text{C}$ , mostrando as características da colônia. O isolado BO05 obteve porcentagem de enraizamento 100%, acima do tratamento hormonal com ANA, e maior peso de massa seca de raiz. Fonte: arquivo pessoal da autora.

O isolado SY30 (figura 8) também tem formato de bastonete, porém tem uma aparência bastante distinta do isolado BO05. SY30 apresenta um formato de bastonete mais comprido, com ondulações e deformações na superfície e aspecto piloso. O aspecto da colônia é de coloração esbranquiçada, opaca sem brilho, com bordas onduladas e de aspecto liso e uniforme. Também pode se tratar de uma bactéria do gênero *Bacillus*.

Embora as características morfológicas dos isolados indiquem que se tratam de dois isolados de *Bacillus*, esses dados não são suficientes para a identificação taxonômica dos isolados em estudo. A identificação de bactérias pode ser realizada com base em análises moleculares que utilizam o sequenciamento de regiões específicas. Nesse projeto, a última etapa para conclusão das atividades seria o sequenciamento da região 16S rRNA, para

obtermos informações a nível do gênero dos isolados. Com base nisso, sabemos que a identificação molecular desses isolados é uma etapa importante a ser realizada.



**Figura 8.** Eletromicrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura, caracterizando o isolado SY30 em grande aumento e sua colônia. (A) Imagem ampliada do isolado mostrando suas características físicas e pequenas estruturas. (B) Pequena aglomeração do isolado, mostrando com maior nitidez a morfologia do microrganismo. (C) Placa de petri para reativação da bactéria após conservação em  $-20^{\circ}\text{C}$ , mostrando as características da colônia. O isolado SY30 obteve porcentagem de enraizamento 100%, acima do tratamento hormonal com ANA, e maior peso de massa seca de raiz. Fonte: arquivo pessoal da autora.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que bactérias isoladas da rizosfera de mudas de videira da região de Caldas-MG podem abrigar isolados promissores que podem ser usados no enraizamento e promoção de crescimento de mudas de videira. Os isolados BO05, SY30, SY18, e SY04 foram os que mais se destacaram e apresentam potencial para serem utilizados como promotores de enraizamento e crescimento em mudas de videira da variedade IAC 572. A utilização desses isolados foi igual ou melhor que o tratamento com hormônio Ácido1-naftaleno-acético (ANA). A aplicação desses isolados promoveu um bom desenvolvimento radicular nas estacas, isso pode auxiliar em: melhoria da absorção de água e nutrientes, aumento da sustentação da planta e, por consequência, pode auxiliar o desenvolvimento da parte aérea. Embora não seja possível afirmar, esses isolados parecem fazer parte do gênero *Bacillus*, uma vez que possuem características morfológicas de colônia semelhantes a muitos dos isolados de *Bacillus* já conhecidos. O gênero *Bacillus* é amplamente utilizado na agricultura, pois apresenta a capacidade de auxiliar as plantas no enraizamento e tem sido amplamente utilizado como base para formulações de produtos de controle de fitopatógenos. Além disso, esses microrganismos também são capazes de auxiliar na disponibilidade de nutrientes inorgânicos para as plantas, como potássio e ferro. O uso desses microrganismos pode servir de alternativa para complementação ou substituição das doses de reguladores de crescimento como ANA ou AIB, tornando o processo de formação de mudas mais segura e sustentável.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C. et al. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. *Trends in Biotechnology*, v. 34, n. 11, p. 847–850, nov. 2016.

CAMPISANO, A. et al. Diversity in Endophyte Populations Reveals Functional and Taxonomic Diversity between Wild and Domesticated Grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 66, n. 1, p. 12–21, fev. 2015.

DE SOUSA, S. M. et al. Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 40, n. 2, p. 867–877, abr. 2021.

EMBRAPA. Sistema de Produção de Uva de Mesa. Disponível em:

<[http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema\\_producao/spuva/producao.html#topo](http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/producao.html#topo). Acesso em: 27 jul. 2023.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 1–15, 2012.

HAÇ-WYDRO, K.; FLASIŃSKI, M. The studies on the toxicity mechanism of environmentally hazardous natural (IAA) and synthetic (NAA) auxin – The experiments on model *Arabidopsis thaliana* and rat liver plasma membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 130, p. 53–60, jun. 2015.

LOCONSOLE, Danilo; CRISTIANO, Giuseppe; DE LUCIA, Barbara. Improving Aerial and Root Quality Traits of Two Landscaping Shrubs Stem Cuttings by Applying a Commercial Brown Seaweed Extract. *Horticulturae*, v. 8, n. 9, p. 806, 2022.

PARK, S. et al. A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 179, dez. 2021.

PEREIRA, G. M. A. INTERAÇÃO DE BACTERIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO COMO INOCULANTES NA CULTURA DO MILHO. Goiânia, 2018.

PREMACHANDRA, D.; HUDEK, L.; BRAU, L. Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, v. 6, n. 3, 2016.

REGINA, M. D. A.; SOUZA, C. R. D.; DIAS, F. A. N. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 897–904, set. 2012.

ROSA, Mauro Mesko et al. Desenvolvimento inicial de plântulas de arroz através do tratamento de sementes com hormônio, fertilizante e protetor. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp*, p. 1287-1299, 2017.

SINGH, M., 2002. Response of plant growth regulators and wrappers on air-layering of guava (*Psidium guajava* L.). *Advances in Plant regSciences (Muzaffarnagar)*, vol. 15, no. 1, pp. 153-157

SINGH, B.; CHEEK, H. D.; HAIGLER, C. H. A synthetic auxin (NAA) suppresses secondary wall cellulose synthesis and enhances elongation in cultured cotton fiber. *Plant Cell Reports*, v. 28, n. 7, p. 1023–1032, jul. 2009.

TAO, J.-J. et al. The Role of Ethylene in Plants Under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 27 nov. 2015.

VERMA, P.; CHAUHAN, P. S.; CHANDEL, J. S. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and IBA treatments on rooting in cuttings of apple (*Malus × domestica* Borkh.) clonal rootstock Merton 793. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 9, n. 2, p. 1135–1138, 1 jun. 2017.

WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, v. 7, p. e7258, 23 jul. 2019.

ZIEDAN, E. H. E.; EL-MOHAMEDY, R. S. R. Application of *Pseudomonas fluorescens* for controlling root-rot disease of grapevine. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v. 4, n. 5, p. 346-353, 2008.