



**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**INFLUÊNCIA BACTERIANA EM ROSEIRA: REDUÇÃO DO  
MOFO CINZENTO E MELHORIA EM CARACTERÍSTICAS  
AGRONÔMICAS**

**LAVRAS – MG  
2019**

**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**INFLUÊNCIA BACTERIANA EM ROSEIRA: REDUÇÃO DO MOFO CINZENTO E  
MELHORIA EM CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof(a). Dr(a). Joyce Dória  
Orientador(a)

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Coorientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Araújo, Neilton Antonio Fiusa.

Influência bacteriana em roseira : Redução do mofo cinzento e  
melhoria em características agrônômicas / Neilton Antonio Fiusa  
Araújo. - 2019.

60 p.

Orientador(a): Joyce Dória.

Coorientador(a): Eduardo Alves, Filipe Almendagna

Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Floricultura. 2. Fitopatologia. 3. Agricultura Orgânica. I.  
Dória, Joyce. II. Alves, Eduardo. III. Rodrigues, Filipe  
Almendagna. IV. Título.

**NEILTON ANTONIO FIUSA ARAÚJO**

**INFLUÊNCIA BACTERIANA EM ROSEIRA: REDUÇÃO DO MOFO  
CINZENTO E MELHORIA EM CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS**

**BACTERIAL INFLUENCE IN ROSA: GRAY MOLD REDUCTION AND  
IMPROVEMENT IN AGRONOMIC CHARACTERISTICS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de agosto de 2019.

Prof. Dr. Moacir Pasqual	DAG/ UFLA
Profa. Dr <sup>a</sup> . Ester Alice Ferreira	EPAMIG
Prof. Dr. José Evando Aguiar Bezerra Júnior	UFPI
Profa. Dr <sup>a</sup> . Beatriz Meirelles Barguil	UESPI

Profa. Dr. Joyce Dória  
Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Coorientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues  
Coorientador

**LAVRAS- MG  
2019**

*Ao meu pai  
À minha família*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura pela oportunidade concedida para realização do Doutorado;

A Deus por guiar meus passos e iluminar minha mente;

A Oxalá por guiar meus passos, me ensinar e proteger para que eu vença meus desafios;

Aos mestres ascensionados que compartilham seus conhecimentos, me guiam e me ensinam a aproveitar cada momento único dessa jornada terrestre;

A toda equipe NEPAFLOR pelos anos maravilhosos, alegrias, brincadeiras, festas, viagens e ensinamentos dados a mim. Por terem me recebido e transformado a UFLA numa segunda casa com todo amor que me foi dedicado, pela oportunidade de trabalhar com a floricultura e ser meu porto seguro todas as vezes que eu sentia que não conseguiria, levo vocês comigo por onde for!

Ao Professor Moacir Pasqual, à Prof(a) Joyce Dória e meus colegas de laboratório. Um agradecimento especial ao Filipe Almendagna (Batata) que sempre me auxiliou quando precisei de ajuda, cedendo tempo mesmo quando estava muito ocupado, ao Vantuil e Claret que me ensinaram desde minha chegada e dão vida ao laboratório, a Sulamara que com seu jeitinho doce me auxiliou e deixou o ambiente tranquilo para que esse trabalho fosse realizado e ao Altino pela amizade e histórias compartilhadas durante o doutorado.

Aos meus colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica por toda ajuda dada, ensinamentos compartilhados e pela amizade construída durante esses anos;

À professora Beatriz Barguil que sempre me incentivou desde a graduação a chegar até aqui e cujo incentivo foi essencial para que hoje eu pudesse tornar esse sonho possível;

À família Lua Branca por ter resgatado minha paz de espírito e me recebido com muito amor.

Às minhas amigas do pole dance e do tecido acrobático que alegraram minha vida fora da UFLA e elevaram minha autoestima.

Aos amigos que aqui fiz por todos os momentos vividos e ensinamentos sobre a vida que compartilharam comigo fora dos prédios da UFLA;

À minha mãe que mesmo de longe sempre esteve presente torcendo e incentivando para que hoje pudesse chegar a esse momento;

Ao meu pai adotivo que mesmo não estando presente em vida contribuiu com minha formação e nossa ligação de amor me guia em cada passo que dou e ao meu pai biológico que depois de tantos anos separados, hoje me enche de amor para que eu alcance meus objetivos;

Ao meu irmão que me dá forças e proteção e é meu exemplo de amor e dedicação e que eu não sei expressar em palavras o quanto eu o amo e admiro;

À minha família que compreende minhas ausências e torcem para que as coisas sempre ocorram bem;

E aos seres do mundo espiritual que emanam boas vibrações para que conquistemos nossos objetivos com o coração cheio de esperança

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO GERAL

A floricultura é um ramo do agronegócio que abrange desde flores de corte a plantas envasadas e folhagens. Sua demanda tem crescido no mercado internacional, o que levou muitos profissionais a buscar tecnologias que possibilitem a melhoria dos produtos, seja em questões de qualidade, beleza e durabilidade. No Brasil, esse setor vem em crescimento constante, tendo ocorrido um aumento de 4% no valor de mercado em 2018 em comparação ao ano anterior, chegando a um total de R\$ 7,2 bilhões. Dentre as flores de corte, as rosas se destacam no mercado nacional e internacional. Para a sua produção são utilizados produtos químicos, os quais são aplicados em larga escala, podendo trazer prejuízos para o meio ambiente e para o agricultor. Portanto, uma alternativa que vem se consolidando é o uso de microrganismos benéficos, que podem atuar tanto no controle de doenças, quanto na promoção do crescimento das plantas e na durabilidade das hastes. A inoculação com as bactérias promotoras de crescimento, pode aumentar a produção e melhorar a qualidade das flores produzidas, bem como influenciar a quantidade e qualidade dos óleos produzidos. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho estudar o potencial de bactérias promotoras de crescimento no manejo do mofo cinzento e na produção de rosas. O primeiro experimento baseou-se na seleção de bactérias para o controle de *Botrytis cinerea*, principal patógeno da roseira, na pós colheita das hastes. que resultou na seleção de quatro bactérias que foram selecionadas devido ao seu potencial de produção de compostos antifúngicos bioativos e voláteis, onde auxiliaram no controle do patógeno e aumentaram a durabilidade das hastes florais, quando aplicadas diretamente em hastes florais obtidas no ponto de colheita. A partir dessa seleção, realizou-se o segundo experimento, que objetivou estudar o efeito das quatro bactérias selecionadas na produção de hastes florais e na quantidade e composição química dos óleos essenciais. a aplicação dos microrganismos selecionados para a produção em estufas não só melhorou as características agronômicas relativas a produção como o tamanho das hastes e dos botões florais, como aumentou a durabilidade das flores, além de aumentar o teor de óleos essenciais produzidos, estimulando a produção de compostos de interesse para a indústria química, como o Óxido de Carofileno,  $\alpha$ -Selineno, Limoneno e  $\alpha$ -Farneseno. Assim, esse trabalho demonstrou o potencial do uso de bactérias promotoras de crescimento na proteção ao mofo cinzento e na produção de rosas vermelhas das variedades “Tonight” e “Príncipe Negro”.

**Palavras-chave:** Bactérias. Floricultura. Rosas.

## ABSTRACT

Floriculture is a branch of agribusiness that ranges from cut flowers to potted plants and foliage. Its demand has grown in the international market, which has led many professionals to seek technologies that enable the improvement of products in terms of quality, beauty and durability. In Brazil, floriculture has been growing steadily, with a 4% increase in market value in 2018 compared to the previous year, reaching a total of R \$ 7.2 billion. Among the cut flowers, roses stand out in the national and international market. For its production are used chemicals applied on a large scale, which can cause damage to the environment and the farmer. Therefore, an alternative that has been consolidating is the use of beneficial microorganisms, which can act in disease control, in promoting plant growth and in stems durability. Inoculation with growth promoting bacteria can increase yield and improve flowers quality, as well as influence the quantity and quality of oils produced. Thus, the objective of this work was to study the potential of growth promoting bacteria in management of gray mold and rose production. The first experiment was based on selection of bacteria for the control of *Botrytis cinerea*, the main pathogen of the rose bush, after stalk harvest. This resulted in selection of four bacteria that were selected due to their potential to produce bioactive and volatile antifungal compounds, which helped control the pathogen and increased the durability of flower stems when applied directly to flower stems obtained at the harvest point. From this selection, the second experiment was carried out, which aimed to study the effect of the four selected bacteria on the production of floral stems and on the quantity and chemical composition of the essential oils. The application of the selected microorganisms for the production in greenhouses not only improved the agronomic characteristics related to the production as the size of the stems and the flower buds, but also increased the durability of the flowers, besides increasing the essential oils produced, stimulating the production of compounds of interest to the chemical industry, such as Carophylene Oxide,  $\alpha$ -Selinene, Limonene and  $\alpha$ -Farnesene. Thus, this work has demonstrated the potential of using growth promoting bacteria to protect gray mold and to produce red roses from “Tonight” and “Black Prince” varieties.

**Keywords:** Bacteria. Floriculture. Roses.

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1.	Benefício dos microrganismos promotores de crescimento em flores.....	12
2.2.	Microrganismos e a durabilidade das hastes florais.....	13
2.3.	Microrganismos controlando doenças em flores.....	15
2.4.	Influência na produção dos óleos essenciais .....	16
3.	REFERÊNCIAS .....	18

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1 : BACTÉRIAS NO CONTROLE DE *BOTRYTIS CINEREA* NA PÓS-COLHEITA DE ROSAS DE CORTE .....

1.	INTRODUÇÃO.....	25
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.	CONCLUSÃO .....	38
5.	AGRADECIMENTOS.....	38
6.	REFERÊNCIAS .....	39

#### ARTIGO 2: BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ROSAS .....

1.	INTRODUÇÃO.....	45
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.	CONCLUSÃO .....	55
5.	AGRADECIMENTOS.....	56
6.	REFERÊNCIAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A floricultura é um ramo do agronegócio que está em ascensão em muitos países ao redor do mundo devido aos seus mais variados produtos, abrangendo desde flores de corte a plantas envasadas e folhagens. Sua demanda tem crescido no mercado internacional, levando muitos produtores a voltar os olhares para tecnologias que possibilitem a melhoria dos produtos em questões de qualidade, beleza e durabilidade. No cenário mundial, a exportação de flores cresceu de U\$ 8 bilhões em 2006 para U\$ 13 bilhões em 2015, tendo uma taxa de crescimento anual em torno de 5%, onde as principais flores de corte exportadas são as rosas, as gérberas e os crisântemos (HANKS, 2018; VAHONIYA et al., 2018). No Brasil, esse setor vem crescendo constantemente, tendo um aumento de 4% no valor de mercado em 2018 em comparação ao ano anterior, chegando a R\$ 7.2 bilhões, sendo concentrado principalmente no mercado doméstico (JUNQUEIRA et al., 2018).

As flores são vulneráveis a diversos fatores que afetam a qualidade da produção e a durabilidade das hastes, tais como descoloração de folhas e pétalas, murchas prematuras e ataque de microrganismos patogênicos. Para evitar esses problemas, é adotado o manejo integrado em toda a cadeia produtiva, sendo utilizadas práticas para reduzir a perda de água, limitar a senescência das flores e controlar as doenças que possam aparecer tanto na produção, quanto na pós-colheita (SCARIOT et al., 2014).

Porém, esse manejo integrado utiliza em sua maioria produtos químicos, os quais devido a sensibilidade e suscetibilidade das espécies vegetais a patógenos, são aplicados em larga escala, podendo acarretar prejuízos tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. Portanto, uma alternativa que vem se consolidando é o uso de microrganismos benéficos que podem atuar tanto no controle de doenças, como na promoção do crescimento das plantas, auxiliando também na durabilidade das hastes (TSUDA et al., 2016).

O uso de bactérias promotores de crescimento em plantas (BPCPs) afetam o desenvolvimento da planta de forma direta e indireta, sendo identificados alguns processos principais que auxiliam nesse crescimento por parte dos microrganismos: a produção de hormônios, como auxinas e citocininas, e vitaminas; a fixação de nitrogênio atmosférico; a solubilização de fosfato inorgânico e a mineralização do fosfato e outros nutrientes; o controle de microrganismos fitopatogênicos (ESITKEN et al., 2010).

A inoculação com microrganismos, como as bactérias promotoras de crescimento, pode aumentar a produção e melhorar a qualidade das flores produzidas, além de poder influenciar a quantidade e a qualidade dos óleos produzidos (MOSTAFA et al., 2019). As

plantas possuem em sua fisiologia um metabolismo secundário que é responsável pela síntese de substâncias bioativas, que providenciam proteção contra fatores externos e auxilia na interação com o meio ambiente. Entre essas substâncias, destacam-se os óleos essenciais, que são substâncias bioativas, cujas suas moléculas têm sido amplamente estudadas devido ao seu interesse nas mais diversas indústrias (ZAKER, 2016; BEHBAHANI et al., 2018; PETRETTO et al., 2018). Embora existam diversos estudos nas mais variadas culturas de interesse agrícola mostrando a influência positiva do uso de microrganismos eficientes na agricultura, ainda são escassos os trabalhos que visem elucidar seus efeitos na floricultura. Dessa forma, objetivou-se com esta revisão realizar um levantamento do efeito de microrganismos promotores de crescimento vegetal para a produção de flores, levando em consideração fatores como aumento da durabilidade por retardo na senescência, controle de doenças e melhoria na produção das hastes e óleos essenciais

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Benefício dos microrganismos promotores de crescimento em flores**

A utilização de microrganismos promotores de crescimento em espécies de flores de corte proporciona um balanço na absorção de nutrientes, aumenta a absorção de nitrogênio e fósforo por algumas espécies, devido principalmente ao potencial de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato que alguns microrganismos possuem, a exemplo das bactérias, proporcionando uma interação benéfica com as plantas (QASIM et al., 2014). O potencial de fixação de nitrogênio e a solubilização de fosfato são alguns dos fatores relacionados ao aumento de tamanho de plantas, peso de folhas frescas, tamanho de hastes e botões florais, além de melhoria na quantidade de flores produzidas (YOUNIS et al. 2014)

As bactérias promotoras de crescimento podem atuar diretamente na planta pela facilitação da aquisição dos nutrientes, ou modulando a produção de hormônios responsáveis pelo crescimento, esse efeito já foi observado em espécies de Gladiolos, onde a inoculação de BPCPs promoveram o aumento das hastes e aumento no tamanho e número de flores. Alguns gêneros de bactérias, como *Azospirillum*, além de serem responsáveis pela fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, também podem estar envolvidos na produção de hormônios como o ácido indol-acético (AIA), ácido giberélico (GA) e citocininas, os quais são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas (QASIM et al., 2014).

A produção de citocininas já foi relatada também em estirpes de *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa*. Embora alguns fitopatógenos também possam produzir esse fitormônio, a principal diferença entre eles é que as citocininas produzidas pelos microrganismos benéficos estimulam processos metabólicos no crescimento das plantas, enquanto que as dos fitopatógenos causam efeito inibitório. De forma similar, as auxinas produzidas por microrganismos benéficos se relacionam com o crescimento da planta, aumento da área radicular e promove a nodulação das raízes (GLICK, 2012).

Algumas bactérias como as do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*, possuem a facilidade de colonizar as raízes das plantas por possuírem características como multicamadas na parede celular, endósporos resistentes à estresse e secretarem substâncias antibióticas, as quais permitem a sobrevivência nos mais variados ambientes por longos tempos (RICHARDSON et al., 2009). A utilização de bactérias promotoras de crescimento, como *Bacillus pumilus*, também tem sido relatada auxiliando no manejo da fitotoxicidade de plantas a metais pesados e pesticidas agindo também como biorremediadores (CHOUDHARY et al., 2017).

Estudos indicam que esses microrganismos também podem auxiliar plantas na resistência a estresse salinos, já que a associação das plantas com estas bactérias corrobora com a manutenção das atividades fisiológicas ótimas do hospedeiro, que são reduzidas em situação de estresse, além de aumentar a produção de pigmentos fotossintéticos, promovendo maior crescimento das culturas (ANSARI et al., 2019). A indução de resistência à patógenos através da inoculação de BPCPs já foi observada em espécies de antúrios, isso se deve porque essa interação estimula a acumulação de ácido jasmônico, promove a atividade de enzimas antioxidantes e a expressão de genes associados com a defesa da planta, além de estimular a produção de sideróforos (LIN et al., 2019)

## **2.2. Microrganismos e a durabilidade das hastes florais**

Assim como a solução a qual as flores de corte são submetidas para sua conservação auxilia na durabilidade, ela também pode corroborar com a proliferação de microrganismos prejudiciais. Isso porque nessas solução são adicionadas sacarose que podem servir tanto para a manutenção das atividades fisiológicas pós-colheita das hastes como também de substrato para a proliferação de microrganismos que podem causar a oclusão dos vasos condutores pela produção de exopolissacarídeos, enzimas que degradam o tecido vegetal e hormônios que ocasionam a senescência, como o etileno. Entre os principais gêneros de bactérias que foram

identificadas causando oclusão em hastes de flores estão as dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Erwinia* (FARAGHER et al., 2010; WILLIAMSON et al., 2018).

As BPCPs podem auxiliar na durabilidade das hastes na pós colheita, controlando os microrganismos prejudiciais o que auxilia na durabilidade das flores, já que essas bactérias causam uma interação benéfica com as espécies vegetais, produzindo compostos que podem impedir a colonização pelos microrganismos que causam oclusão e também utilizam as fontes de carbono como substrato para sua multiplicação (CARLSON et al., 2015).

Estudos indicam que o pH da solução de conservação pode influenciar na durabilidade, quanto menor for o pH da solução, maior será a sua durabilidade. Isso se deve ao fato de a solução com pH mais ácido auxiliar na redução do crescimento de bactérias, que causam a oclusão dos vasos, e algumas BPCPs podem produzir compostos que acidificam o meio impedindo a proliferação de microrganismos patogênicos (REGAN et al., 2010). Em contrapartida, nas espécies tolerantes ao entupimento dos vasos por microrganismos, a acidificação da solução de “*pulsing*” não influencia na durabilidade das hastes florais, indicando que outros fatores podem ser responsáveis pelo início da senescência nessas espécies (CARLSON et al., 2013).

Embora a proliferação de microrganismos no substrato de conservação das hastes possa ser citado como um dos fatores que levam a diminuição na durabilidade e, como consequência, a perda da qualidade; a sensibilidade das flores ao etileno parece ser o principal fator que leva à diminuição da sua durabilidade, principalmente devido à sensibilidade a esse hormônio conforme as flores envelhecem (WILLIAMSON et al., 2018).

A durabilidade das hastes é determinada pela abertura floral e abscisão das pétalas que murcham e definham. Esse processo é controlado pelo hormônio vegetal etileno, que é produzido nos tecidos das plantas, porém também pode ser produzido por alguns microrganismos como fungos e bactérias, onde a exposição ao etileno de forma exógena pode acelerar o processo de senescência, existindo diferenças significantes na sensibilidade a esse hormônio entre as espécies e entre cultivares de mesma espécie (SCARIOT et al., 2014).

As flores podem ser classificadas quanto a sensibilidade ao etileno em flores que a senescência é regulada devido ao aumento da quantidade de etileno, seja pelo envelhecimento ou devido à polinização; flores que só se tornam sensíveis ao hormônio e passam a produzir mais após a polinização; e flores que são sensíveis ao etileno na abertura do botão floral, mas não produzem quantidades elevadas do hormônio a medida que envelhecem, nesse último grupo se enquadram as rosas (KUMAR et al., 2008; SCARIOT et al., 2014). O efeito da

senescência floral causado pelo etileno pode ocasionar o desenvolvimento de outras desordens fisiológicas, como o favorecimento da suscetibilidade a patógenos, tal como *Botrytis cinerea*, um dos principais patógenos da floricultura (SEGLIE et al., 2012).

Algumas BPCPs conseguem retardar o processo de senescência das flores de corte e podem atuar como antienvelhecimento. Estas bactérias tem a capacidade de produzir a enzima ACC desaminase que sequestra e cliva o ACC em “alfa cetobutirato” e íons  $\text{NH}_4^+$ , de forma que evita que concentrações altas de etileno se acumulem nos tecidos vegetais sensíveis. Esse efeito de inibição do etileno por parte de bactérias promotoras de crescimento já foi observado em flores como as tulipas, aumentando a durabilidade das flores e mantendo a qualidade visual (ALI et al., 2012).

Esses microrganismos promotores de crescimento capazes de produzir ACC desaminase podem se mostrar importantes para a floricultura, pois podem ser usados como alternativa ao ethephon, produto comercial usado para inibir o alongamento das hastes em algumas plantas envasadas que pode afetar a abertura floral pelo seu efeito inibitório no etileno. Assim, em flores de corte comerciais como rosa, cravo, gerânio e zínia, que apresentam alta sensibilidade a esse hormônio, ou flores moderadamente sensíveis como as tulipas, narcisos, crisântemos e anêmonas, os microrganismos promotores de crescimento podem ser associados para evitar o uso de substâncias químicas e melhorar as suas características comerciais, como diâmetro floral e durabilidade (BASHIR et al., 2019)

### **2.3. Microorganismos controlando doenças em flores**

Embora o controle de doenças ocorrentes em espécies de flores de corte seja focada no uso de produtos químicos e cultivares resistentes, o estudo de organismos antagonista tem sido feito no intuito de encontrar novas fontes de controle, pois muitos patógenos começam a apresentar resistência aos métodos tradicionais de controle. Entre os fungos utilizados no controle de doenças ocorrentes em flores, como o crisântemo, pode-se citar espécies de *Verticillium lecanii*, *Aphanocladium álbum* e *Cladosporium spp.*, os quais apresentam relatos de potenciais fontes de controle para doenças como a ferrugem branca (*Puccinia horiana*) (TORRES et al., 2017), embora seu uso ainda não seja amplamente difundido. Ao contrário das espécies mencionadas anteriormente, fungos do gênero *Trichoderma* possuem amplo uso no controle de doenças devido ao seu potencial de controle já conhecido e estudado. Em gladiólos, já foi comprovado a eficiência de estirpe da espécie *Trichoderma harzianum* no controle da podridão do cormo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli*) (WALID et al.; 2010).

De forma semelhante aos fungos citados, as bactérias do gênero *Bacillus* já são bem conhecidas pelo seu antagonismo contra outros microrganismos que afetam plantas e pela produção de metabólitos que são benéficos para o crescimento e produção de diversas culturas (LI et al.; 2018). O uso de estirpes da bactéria *Aneurobacillus migulanus* não só também contribuiu para redução da incidência da podridão do corno do gladiolo, como também influenciou positivamente a produção das plantas, emitindo maiores hastes com tamanho de flor maior, mostrando que o uso de microrganismos pode servir não apenas como agente de controle de patógeno, mas também como estimulante para crescimento e produção (WALID et al., 2010).

Bactérias como a *Serratia plymuthica*, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* também foram relatadas com potencial de biocontrole contra *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*, patógenos da maioria das flores de corte. Essas bactérias apresentam potencial para induzir resistência sistêmica em plantas (KARMENSKY et al., 2003). Mixobactérias também já tem sido relatadas como potencial antagonistas para doenças como a podridão mole de callas, causada pela *Pectobacterium carotovorum* (LI et al., 2018)

#### **2.4. Influência na produção dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais são substâncias produzidas pelas plantas que se relacionam com diversas funções ecológicas, entre elas a atração de polinizadores e a defesa da planta a fatores ambientais. Como outros compostos secundários, esses compostos são respostas da planta às variações ambientais, por essa razão, a produção dos óleos essenciais não depende somente de fatores genéticos ou estágio de desenvolvimento. As mudanças no ambiente podem influenciar nas rotas bioquímicas e em processos fisiológicos que alteram o metabolismo da planta e, assim, na biossíntese de óleos essenciais (PRINS et al., 2010).

A aplicação exógena de reguladores de crescimento vegetais, como os produzidos pelos microrganismos promotores de crescimento, pode influenciar a produção desses compostos secundários pelas plantas. Alguns estudos indicam que isso se deve ao fato que dessa aplicação proporciona maior tamanho de folhas e flores, assim, a produção de óleo seria incrementada devido ao aumento da biomassa (FAROOQI et al., 2003). Porém, as plantas podem responder de forma diferenciada à ação dos fitormônios exógenos, onde o aumento no rendimento dos óleos essenciais pelo aumento dos órgãos vegetais pode ser ocasionado pela produção de auxinas, ou a sua síntese nos órgãos pode ser aumentada pela produção exógena

de giberelinas, podendo ocasionar também possíveis modificações em sua composição (AMIRI et al., 2014; MOSTAFA et al., 2019)

Outros estudos confirmam que a aplicação de microrganismos, como estirpes de *B. subtilis*, aumentaram em mais de duas vezes o acúmulo de óleos essenciais em plantas aromáticas, indicando a indução de biossíntese de terpenos. Essa indução de resposta da planta é considerada uma relação benéfica entre microrganismo-planta (BANCHIO et al., 2009). O aumento do óleo também pode ser devido ao aumento do sistema radicular proporcionado por essa interação e pela maior produção extracelular de fosfatase ácida, que permite maior aquisição de compostos fosfatos orgânicos (BOUWMEESTER et al., 2007).

Muitos óleos essenciais possuem em sua composição substâncias que se relacionam com a defesa contra microrganismos e/ ou herbivoria, a interação de bactérias promotoras de crescimento pode auxiliar na ativação do sistema de defesa das plantas o que faz com que essas moléculas sejam produzidas, alterando a composição dos óleos essenciais como forma de preparar a planta para futuras infecções (BANCHIO et al., 2008). Outro fator que influencia na composição e quantidade dos óleos é a aplicação de microrganismos que melhoram a disponibilidade e absorção de nitrogênio e fósforo pelas plantas. Esses dois elementos desempenham um papel importante na estrutura e composição dos óleos essenciais, como por exemplo o isopentenil-pirofosfato e o dimetilalil pirofosfato (SANGWAN et al., 2001).

A utilização de microrganismos eficientes pode se fazer útil para a floricultura por meios como o controle da senescência, onde a produção de enzimas naturais que retardam esse processo podem ser estudadas, pelo aumento da produção, com o aumento dos órgãos de interesse pela produção de fitormônios ou pela associação com as plantas que permite uma maior aquisição de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, podendo se correlacionar com a melhoria na produção dos óleos essenciais, bem como pelo controle de patógenos que afetam as culturas, abrindo assim um campo de interesse para estudos nessa área.

### 3. REFERÊNCIAS

- ALI, S., CHARLES, T.C.; GLICK, B.R. Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, p. 1139-1144, 2012.
- AMIRI, S.; SHARAFZADEH, S.; ORDOOKHANI, K. The Effect of gibberellic acid and benzyladenine on growth and essential oils of german chamomile. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, v. 4, n. 1, p. 186-188, 2014.
- ANSARI, F.A.; AHMAD, I.; PICHTEL, J. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10. *Applied Soil Ecology*, v. 143, p. 45-54, 2019.
- BANCHIO, E., BOGINO, P.C., ZYGADLO, J., GIORDANO, W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, n. 10, p. 766-771, 2008.
- BANCHIO, E.; XIE, X.; ZHANG, H.; PARÉ, P.W. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 2, p. 653-657, 2009.
- BASHIR, M.; ASIF, M.; NAVEED, M.; QADRI, R.W.K.; FARIED, N.; ANJUM, F. Postharvest exogenous application of various bacterial strains improves the longevity of cut “royal virgin” tulip flowers. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, V. 56, n.1, p. 1-17, 2019.
- BEHBAHANI, B.A.; YAZDI, F.T.; VASIEE, A.; MORTAZAVI, S.A.; *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and commercial strains causing infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 114, p 449-452, 2018.
- BOUWMEESTER, H.J.; ROUX, C.; LOPEZ-RAEZ, J.A.; BECARD, G. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Sciences*. v. 12, p. 224–230, 2007.
- CARLSON, A.S.; DOLE, J.M. Postharvest water quality affects vase life of cut *Dendrathera*, *Dianthus*, *Helianthus* and *Zinnia*. *Scientia Horticulturae*, n. 164, p. 277-286, 2013.
- CARLSON, A.S.; DOLE, J.M.; MATTHYSSE, A.G.; HOFFMANN, W.A.; KORNEGAY, J.L. Bacteria species and solution pH effect postharvest quality of cut *Zinnia elegans*. *Scientia Horticulturae*, v. 194, p. 71-78, 2015.
- CHOUDHARY, M., KUMAR, R., DATTA, A., NEHRA, V., GARG, N. Bioremediation of heavy metals by microbes. In: *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*. Springer International Publishing, Cham, v. 1, p. 233–255. 2017.
- ESITKEN, A., YILDIZ, H.E., ERCISLI, S., FIGENDONMEZ, M., TURAN, M., GUNES, A. The effects of the plant growth promoting bacteria (PGPB) on the yield: growth and nutrient contents of organically grown strawberry., *Scientia Horticulturae*, v. 124, p. 62–66, 2010.

FARAGHER, J., GOLLNOW, B., JOYCE, D. Postharvest Handling of Australian Flowers from Australian Native Plants and Related Species. A Practical Manual, 2nd ed. Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), n. 10/027, 2010.

FAROOQI, A.H.A.; KHAN, A.; SHARMA, S. Effect of kinetin and chlormequat chloride on growth, leaf abscission and essential oil yield in *Mentha arvensis*. Indian Perfumer, v. 47, n. 4, p. 359-363, 2003.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, Scientifica, v.1, 15 p, 2012.

HANKS, G. A review of production statistics for the cutflower and foliage sector. The national cut flower centre. 2018.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. Ornamental Horticulture, v. 24, n. 2, p. 155-162, 2018.

KAMENSKY, M.; OVADIS, M.; CHET, I.; CHERNIN, L. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. Soil Biology and Biochemistry, v.35, p. 323–331, 2003.

KUMAR, N., SRIVASTAVA, G.C., DIXIT, K. Flower bud opening and senescence in roses (*Rosa hybrida* L.). Plant Growth Regulation, v. 55, p. 81–99, 2008.

LI, L.; TAN, J.; CHEN, F. *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 shows nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* via the production of a guanidine compound. Biocontrol Science and Technology, v. 1, p. 1-12, 2018.

LI, Z.; WANG, T.; LUO, X.; LUO, X.; LI, X.; XIA, C.; ZHAO, Y.; YE, X.; HUANG, Y.; GU, X.; CAO, H.; CUI, Z.; FAN, J. Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum*. Biological Control, v. 126, p. 36-44, 2018.

LIN, H.; XIONG, J.; ZHOU, H.; CHEN, C.; LIN, F.; XU, X.; OELMÜLLER, R.; XU, W.; YEH, K. Growth promotion and disease resistance induced in *Anthurium* colonized by the beneficial root endophyte *Piriformospora indica*. BMC Plant Biology, n. 19, p. 40, 2019.

MOSTAFA, A.; KHALAFALLAH, M.; SEDERA, S.A.; FATHY, H.; HIGAZY, A. Different methods of bacterial inoculation on the yield of chamomile blossoms and essential oil. Global Journal of Environmental Sciences. Manage, v.5, n.2, p. 237-248, 2019.

PETRETTO, G.; FANCELLO, F.; BAKHY, K.; FAIZ, C.A.; SIBAWAYH, Z.; CHESSA, M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Cuminum cyminum* L. collected in different areas of Morocco. Food Bioscience, n. 22, p. 50-58, 2018.

PRINS, C.L.; VIEIRA, I.J.C.; FREITAS, S.P. Growth regulators and essential oil production. Brazilian Journal of plant physiology, v. 22, n.2, p. 91-102, 2010.

QASIM, M.; YOUNIS, A.; ZAHIR, Z.A.; RIAZ, A.; RAZA, H.; TARIQ, U. Microbial inoculation increases the nutrient uptake efficiency for quality production of *Gladiolus grandiflorus*, Parkistan Journal of Agricultural Sciences, v. 51, n. 4, p. 875-880, 2014.

REGAN; E.M., DOLE; J.M. Determining optimum pH and EC levels for extended vase life of cut Rosa 'Freedom', 'Charlotte', and 'Classy'. Acta Horticulturae, v. 870, n. 35, p. 263-272, 2010.

RICHARDSON, A.E.; BAREA J.M.; MCNEILL A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil, v. 321, n. 1, p. 305–339, 2009.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. The Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation. V. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SCARIOT, V.; PARADISO, R.; ROGERS, H.; PESCALE, S. Ethylene control in cut flowers: classical and innovate approaches. Postharvest Biology and Technology, v. 97, p. 83-92, 2014.

SEGLIE, L.; SPADARO, D., TROTTA, F., GULLINO, M.L., DEVECCHI, M., SCARIOT, V. Use of 1-methylcyclopropene in cyclodextrin-based nanosponges to control grey mould caused by *Botrytis cinerea* on *Dianthus caryophyllus* cut flowers. Postharvest Biology and Technology. v. 64, p. 55–57, 2012.

TORRES, D.E.; ROJAS-MARTÍNEZ, R.I.; ZAVALETA- MEJÍA, E.; Guevara-Fefer, P.; Marquez-Guzman, G.J.; Pérez-Martínez, C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. PLoS ONE, v. 12, n. 1, 16 p., 2017.

TSUDA, K.; TSUJI, G.; HIGASHIYAMA, M.; OGIYAMA, H.; UMEMURA, K.; MITOMI, M.; KUBO, Y.; KOSAKA, Y. Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions. Biological Control, v. 100, p. 63-69, 2016.

VAHONIYA, D.; PANIGRAHY, S.R.; PATEL, D.; PATEL, J. Status of floriculture in India: with special focus to marketing, International Journal of Pure Applied Biosciences, v. 6, n. 2, p. 1434-1438, 2018.

WALID, N.; JIM, M.; STEVE, W. The efficiency of *Trichoderma harzianum* and *Aneurobacillus migulanus* in the control of gladiolus corm rot in soil-less culture system. American Journal of agricultural and biological sciences, n. 5, v. 4, p. 436-445, 2010.

WILLIAMSON, V.G.; JOYCE, D.C. *Boronia heterophylla* vase life is influenced more by ethylene than by bacterial numbers or vase solution pH. Postharvest biology and technology, v. 84, p. 28-35, 2018.

YOUNIS, A.; RIAZ, A.; MUSTAQ, N.; TAHIR, Z.; SIDDIQUE, M.I. Evaluation of the suitability of sewage and recycled water for irrigation of ornamental plants. Communication in Soil Sciences and Plant Analysis, v. 46, p. 62-79, 2015.

ZAKER, M. Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control – a review. *The agriculturists*, v. 14, n. 1, p. 134–141, 2016.

**ARTIGO 1 : BACTÉRIAS NO CONTROLE DE *BOTRYTIS CINEREA* NA PÓS-  
COLHEITA DE ROSAS DE CORTE**

Neilton Antonio Fiusa Araújo; Altino Júnior Mendes Oliveira; Vytória Piscitelli Cavalcanti;  
Eduardo Alves, Moacir Pasqual, Joyce Dória

(Preparado segundo normas NBR 6023)

## RESUMO

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, é uma das principais doenças que apodrecem os botões florais de diversas flores de corte, sendo uma das doenças mais importantes na produção de rosa. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de bactérias no controle de *B. cinerea* na pós-colheita de rosas de corte. Foram utilizadas sete espécies de bactérias que foram avaliadas *in vitro* quanto a produção de metabólitos antifúngicos difusíveis e voláteis. A partir dos resultados foram selecionadas quatro bactérias as quais foram inoculadas em rosas cultivar Tonight no ponto de colheita. Rosas tratadas com as bactérias foram inoculadas com o patógeno *B. cinerea* e avaliou-se o potencial de controle biológico dos microrganismos. Também foi avaliada a durabilidade de rosas tratadas com as bactérias. De acordo com os resultados da produção de compostos bioativos e voláteis foram selecionados as bactérias *Bacillus acidiceler*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Staphylococcus equorum*. As avaliações mostraram que as bactérias *B. acidiceler*, *B. subtilis* e *B. pumilus* foram eficientes no controle de *B. cinerea* na pós-colheita de rosas vermelhas cultivar Tonight e aumentaram a durabilidade das hastes florais.

**Palavras-chave:** *Bacillus*. Rosas vermelhas. Mofo cinzento.

## ABSTRACT

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is one of main diseases that rot the flower buds of various cut flowers, being one of the most important diseases in rose production. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of bacteria on *B. cinerea* control in cut roses postharvest. Seven species of bacteria were used and evaluated in vitro for diffusible and volatile antifungal metabolites production. From the results were selected four bacteria which were inoculated in roses cultivar Tonight at harvest point. Roses treated with the bacteria were inoculated with the pathogen *B. cinerea* and the potential for biological control of the microorganisms was evaluated. The durability of bacteria-treated roses was also evaluated. According to the results of bioactive and volatile compounds productions. *Bacillus acidiceler*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Staphylococcus equorum* bacteria were selected. The evaluations showed that the bacteria *B. acidiceler*, *B. subtilis* and *B. pumilus* were efficient in controlling *B. cinerea* in the post harvest of red roses cultivar Tonight and increased the durability of the floral stems.

**Keywords:** *Bacillus*. Red roses. Gray mold.

## 1. INTRODUÇÃO

O comércio de flores e plantas ornamentais representa um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro, tendo movimentado em torno de R\$ 6,5 bilhões em 2016, com potencial de crescimento anual de até 6%. As flores de corte participam com 34% das movimentações nesse mercado, sendo a rosa a principal espécie cultivada, correspondendo a 30% das espécies produzidas e comercializadas no país. Cultivada desde os tempos antigos devido a sua fragrância e beleza, a rosa apresenta maior demanda entre as flores de corte, existindo cerca de 30.000 variedades, podendo ser comercializada como flor de corte ou planta envasada. Além disso, a rosa é bastante utilizada na ornamentação de eventos como formaturas e casamentos. (JUNQUEIRA et al., 2017).

O mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, é uma das principais doenças que prejudicam os botões florais de diversas flores de corte, sendo uma das mais importantes na produção de rosa. O patógeno ocorre em todo o mundo e quando infecta as rosas causa manchas claras nas pétalas que rapidamente evoluem e adquirem coloração marrom, que pode se estender até o caule, e os botões infectados não abrem. A doença se desenvolve preferencialmente em climas frios, com média de 15 °C, com altos níveis de umidade e pode levar a perdas consideráveis. (WILLIAMSON, 1995).

Estudos voltados para a seleção de microrganismos benéficos como alternativa para o manejo de doenças de plantas tem aumentado e assim, muitos microrganismos têm sido descobertos e utilizados como ferramenta eficaz (LI et al., 2018), pois esses microrganismos proporcionam benefícios para o meio ambiente e fornecem bases para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, fazendo um contraponto ao uso tradicional de defensivos químicos.

Entre os organismos estudados, as bactérias vêm ganhando espaço no controle biológico, sendo utilizadas principalmente estirpes de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e pectobactérias, onde muitas delas além de possuírem a capacidade de controlar fitopatógenos também são capazes de produzir metabólitos secundários que contribuem melhorando o desenvolvimento das plantas (ABDALLAH et al., 2018).

Embora tradicionalmente o controle do *B. cinerea* em rosas de corte seja feito com produtos químicos, outros tratamentos alternativos surgem como opção. Pesquisas comprovam a ação benéfica das bactérias na produção de flores, auxiliando na minimização do amarelecimento das folhas, retardando a senescência, ajudando na quebra de dormência de

sementes, melhorando a qualidade da iniciação floral e as características das flores produzidas.

Nesse contexto, o controle biológico com o uso de bactérias benéficas, mostra-se como forte alternativa a ser aplicada na pós-colheita de rosas. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de bactérias no controle do fitopatógeno *Botrytis cinerea in vitro* e na pós-colheita de rosas de corte.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Aquisição das bactérias e isolamento do patógeno

As bactérias utilizadas foram isoladas a partir de plantas de morangueiro e as demais adquiridas da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação e origem das bactérias utilizadas nos experimentos.

CÓDIGO	BACTÉRIA	SUBSTRATO
CCMA 0057	<i>Bacillus acidiceler</i>	Fruto de Pimenta do mato
CCMA 0084	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fruto de Ananás
CCMA 0058	<i>Bacillus macauenses</i>	Fruto de Pimenta do Mato
132	<i>Bacillus subtilis</i>	Fruto de Morangueiro
CCMA 0098	<i>Bacillus pumilus</i>	Fruto de Pequi
121	<i>Pantoea ananatis</i>	Folha de Morangueiro
44	<i>Staphylococcus equorum</i>	Raiz de Morangueiro

Fonte: Do autor (2019)

O fitopatógeno *B. cinerea* foi isolado a partir de rosas, adquiradas no setor de entomologia da UFLA, Lavras, Minas Gerais, com sintomas de mofo cinzento. Para o isolamento foram utilizadas pétalas com lesões provocadas pelo patógeno, as quais foram cortados fragmentos de 3 mm e submetidos ao processo de assepsia (etanol 70% por 1 min e hipoclorito de sódio a 2% por 3 min, seguida de tríplice lavagem em água destilada esterilizada).

Após assepsia, os fragmentos foram colocados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e foram colocadas para incubação em BOD à 25 °C com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro). O isolamento do patógeno seguiu-se a partir do crescimento de colônias com as características do mesmo. As colônias passaram por identificação através de caracteres morfológicos e foram usadas colônias identificadas do fungo *Botrytis cinerea*, onde foi feito o cultivo monospórico para obtenção de colônias puras

## 2.2. Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis

O experimento foi realizado *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado utilizando placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Nutriente. 2 Discos de 3 mm de diâmetro contendo o micélio de *B. cinerea* foram colocados a 2 cm das bordas da placa e um risco de 3 cm contendo células das bactérias foi feito no centro da placa (Rosa et al., 2010). Cada bactéria constituiu um tratamento, onde o controle foi constituído de uma placa de Petri contendo apenas o fitopatógeno, que foi colocado a 2 cm da borda e feito o risco central utilizando apenas água destilada esterelizada. Seis repetições para cada tratamento foram utilizadas, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

Os tratamentos foram incubados em BOD na temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi analisado após 4 dias de incubação, quando o controle alcançou a borda da placa, sendo medido o crescimento na direção do risco central e na direção oposta.

## 2.3. Produção de metabólitos antifúngicos voláteis

O efeito da produção de metabólitos voláteis pelas bactérias no crescimento da colônia de *B. cinerea* foi avaliado *in vitro*, usando sete tratamentos, constituídos de cada bactéria, e o fitopatógeno como controle, com 4 repetições de uma placa de Petri cada.

Para isso, um disco de 3 mm de diâmetro contendo o crescimento micelial do patógeno foi colocado no centro da placa de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA. As bactérias foram cultivadas por dois dias em placas de Petri separadas de mesmo tamanho, contendo meio 523, o qual foram feitas estrias para espalhar as células na placa. As placas contendo os respectivos microrganismos foram unidas com fita adesiva transparente e colocadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, deixando a placa de Petri com o fitopatógeno sobreposta à placa de Petri com o microrganismo antagonista, segundo metodologia de Vieira et al. (2017). O controle consistiu de placas contendo apenas o disco do fitopatógeno colocado em posição central.

As medições do crescimento micelial foram feitas aos 6 dias, tempo em que o crescimento micelial do tratamento controle, alcançou a borda da placa. O diâmetro do crescimento micelial do fitopatógeno foi avaliado medindo-se dois eixos ortogonais, utilizando duas medidas diametralmente opostas.

#### 2.4. Avaliação do controle em pós colheita de rosas

Para a avaliação do controle de *B. cinerea* na pós-colheita de rosas foram selecionadas as 4 bactérias que apresentaram os melhores resultados nas análises de controle por produção de compostos difusíveis e compostos voláteis, que consistiram os tratamentos. Para a inoculação foi feito o preparo de solução contendo a suspensão dos inóculos das bactérias. A suspensão foi preparada utilizando-se o meio 523 líquido o qual foi colocado 3 alçadas de crescimento bacteriano e deixado em agitação por 48 horas, sendo feito o ajuste da concentração para  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup>.

O teste de controle na pós colheita foi realizado em rosas vermelhas cultivar Tonight adquiridas com produtor no ponto de colheita, as quais foram lavadas em A.D.E. e padronizadas em um tamanho de 50 cm. A inoculação bacteriana foi feita pela imersão das rosas na suspensão, durante 30 minutos. O controle foi feito imergindo as rosas em água destilada esterilizada.

Após a inoculação das bactérias, as rosas foram mergulhadas em suspensão de *B. cinerea* durante 5 minutos. A suspensão foi preparada através da agitação de ADE em placas de Petri contendo o micélio do patógeno com 6 dias, filtrando-se em dupla camada de gaze e ajustando a concentração para  $1,03 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

Decorrido esse tempo, as rosas foram colocadas em copos de 700 mL contendo 500 mL de solução de sacarose a 2%, permanecendo em sala com temperatura controlada de 20 °C, fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. O controle positivo consistiu de rosas inoculadas apenas com o patógeno, e o negativo de rosas não inoculadas. Foram utilizadas 6 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição formada de duas rosas, em delineamento inteiramente casualizado.

As avaliações de severidade da doença foram feitas com a escala de notas descrita por Araújo (1995), que varia de 1 a 10 sendo: 1 = 0%; 2 = 1-2%; 3 = 3-5%; 4 = 6-10%; 5 = 11-15%; 6 = 16-25%; 7 = 26-50%; 8 = 51 a 75%; 9 = 76-99%; 10 = 100% de área lesionada em cada botão. As notas obtidas foram usadas para avaliar a severidade da doença de acordo com o índice de McKinney (McKinney, 1923). As rosas foram avaliadas diariamente até o sétimo dia após a inoculação, período em que as rosas do tratamento controle atingiram ponto de descarte.

Os dados obtidos nas avaliações também serviram de base para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) segundo a fórmula:

$$AACPD = \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

onde:  $y_i$ : índice de doença ou

incidência no tempo  $t_i$ , em dias;  $y_{i+1}$ : índice de doença ou incidência no tempo  $t_{i+1}$ .

## 2.5. Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Ao final do experimento de controle em pós-colheita, fragmentos de pétalas de cada tratamento foram coletados para avaliar a interação do fitopatógeno com as bactérias por microscopia eletrônica de varredura. Os fragmentos coletados foram imediatamente fixados em solução Karnovsky modificada (2,5 % de glutaraldeído, 2,5 % de formaldeído em 0,05 M de cacodilato de sódio, pH 7,2 e 0,001 M de  $\text{CaCl}_2$ ) por 24 horas. Os fragmentos fixados foram transferidos para a solução de cacodilato (0,05 M) e lavados três vezes por 10 minutos. Então, foram lavados em água destilada três vezes e desidratados em soluções com aumento da concentração de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %). Subsequentemente, os fragmentos foram secos em ponto crítico com  $\text{CO}_2$  líquido em aparelho Balzers CPD 030; montados em suporte de alumínio (stubs) e cobertos com ouro (Balzers SCD 050 evaporador) para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 (ALVES, 2005).

## 2.6. Avaliação da durabilidade das rosas tratadas com bactérias

Hastes de 50 cm com flores em ponto de colheita foram inoculadas com as bactérias conforme descrito anteriormente e então colocadas em copos plástico com capacidade para 700 mL contendo 500 mL de solução de sacarose a 2% e fechados com papel filme. Em seguida, foram acondicionadas em sala com temperatura controlada à 20 °C, com fotoperíodo de 12 h. Para as avaliações foram utilizadas 6 repetições, consistindo de 2 flores para cada bactéria, onde flores não inoculadas corresponderam às testemunhas. A durabilidade das flores foi avaliada diariamente, utilizando-se para isso uma modificação da escala descrita por Capdeville et al. (2005), que variou de 6 a 0 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Escala de notas para avaliação da durabilidade de rosas de corte, levando em consideração o estágio da abertura floral.

Nota	Estágio abertura floral
6	Haste floral com folíolos verdes e bem hidratados, com sépalas eretas aderidas, até cerca de 2/3 do seu comprimento, com pétalas externas iniciando abertura (ponto de colheita comercial).
5	Haste com folíolos verdes bem hidratados, flor com sépalas iniciando a curvatura e pétalas externas mostrando-se mais abertas. Pétalas intermediárias iniciando abertura.
4	Haste com folíolos verdes e hidratados, flor com as sépalas quase completamente curvadas. Pétalas externas completamente abertas e iniciando a curvatura dos bordos para fora e pétalas intermediárias bem abertas.
3	Folíolos verdes e hidratados, flor com as sépalas completamente curvadas para baixo. Pétalas externas quase horizontais com os bordos bem curvados, intermediárias abertas e internas iniciando abertura.
2	Folíolos apresentando leve perda de turgidez. Sépalas completamente curvadas para baixo, e pétalas totalmente abertas com estames à mostra.
1	Haste floral exibindo perda generalizada de turgidez e com início de curvatura do pedúnculo.
0	Haste floral totalmente desidratada. Flor morta.

Fonte: Do autor (2019)

Para a avaliação da durabilidade foram consideradas rosas que obtiveram até a nota 3 como o limite das flores que possuíam qualidade comercial e/ou com qualidade para uso em arranjo, abaixo disso, considerado flores em ponto de descarte.

## 2.7. Avaliação da perda de massa

As rosas inoculadas com as bactérias, conforme descrito anteriormente, foram acondicionadas em copos de plástico com capacidade para 700 mL coberto com papel filme e adicionados 500 mL de solução de sacarose a 2% e mantidas em sala com temperatura controlada a 20 °C, com fotoperíodo de 12 h. As rosas foram pesadas diariamente até a perda da qualidade comercial das flores e a perda de massa foi calculada pela diferença de peso entre o dia anterior e o dia seguinte. O percentual total de perda de massa das flores através da diferença de peso do último dia com o primeiro dia de avaliação.

## 2.8. Análise estatística dos dados obtidos

Os dados obtidos foram avaliados quanto a sua normalidade e então submetidos à ANAVA aplicando as análises de regressão e teste de Scott-Knott a 5% para comparação múltipla de médias, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de produção de compostos bioativos (Tabela 1) mostrou que houve inibição do crescimento da colônia do patógeno, sendo observado uma redução que variou de 35,65 % (*Bacillus subtilis*) a 77,10 % (*Bacillus acidiceler*). Já na produção de compostos voláteis, a taxa de inibição do crescimento variou de 5,62 % (*Bacillus macauenses*) a 68,1 % (*B. acidiceler*).

**Tabela 1.** Percentual de inibição do crescimento da colônia de *Botrytis cinerea* pela produção de compostos bioativos e voláteis por bactérias.

BACTÉRIAS	BIOATIVOS	VOLÁTEIS
<i>Bacillus acidiceler</i>	77,10 a*	68,10 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,00 d	27,28 b
<i>Bacillus macauenses</i>	0,00 d	5,62 c
<i>Bacillus subtilis</i>	35,65 c	58,81 a
<i>Bacillus pumilus</i>	65,00 b	29,67 b
<i>Pantoea ananatis</i>	0,00 d	16,85 c
<i>Staphylococcus equorum</i>	76,20 a	35,86 b
Testemunha	0,00 d	0,00 c
C.V. (%)	7,36	21,83

\* Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si no teste Scott-Knott, a 5%. Fonte: Do autor (2019)

O *B. acidiceler* apresentou o melhor desempenho para controle do patógeno *in vitro*, tanto com a produção de compostos difusíveis como na produção de compostos voláteis. *Staphylococcus equorum* mostrou a mesma eficiência que o *B. acidiceler* na produção de compostos difusíveis, também tendo sido eficientes *B. subtilis* e *Bacillus pumilus*, ambas alcançado taxas de inibição de desenvolvimento do patógeno de 35,65 e 65,0 %, respectivamente.

A produção de compostos difusíveis pelas bactérias testadas neste estudo pode indicar o uso de mecanismo de antibiose por parte desses microrganismos, o que confere potencial de biocontrole do patógeno nas culturas que o mesmo afeta. Alguns microrganismos durante o processo de antibiose produzem compostos enzimáticos com forte potencial de biocontrole, os quais são capazes de degradar as paredes celulares dos fitopatógenos, já outros conseguem

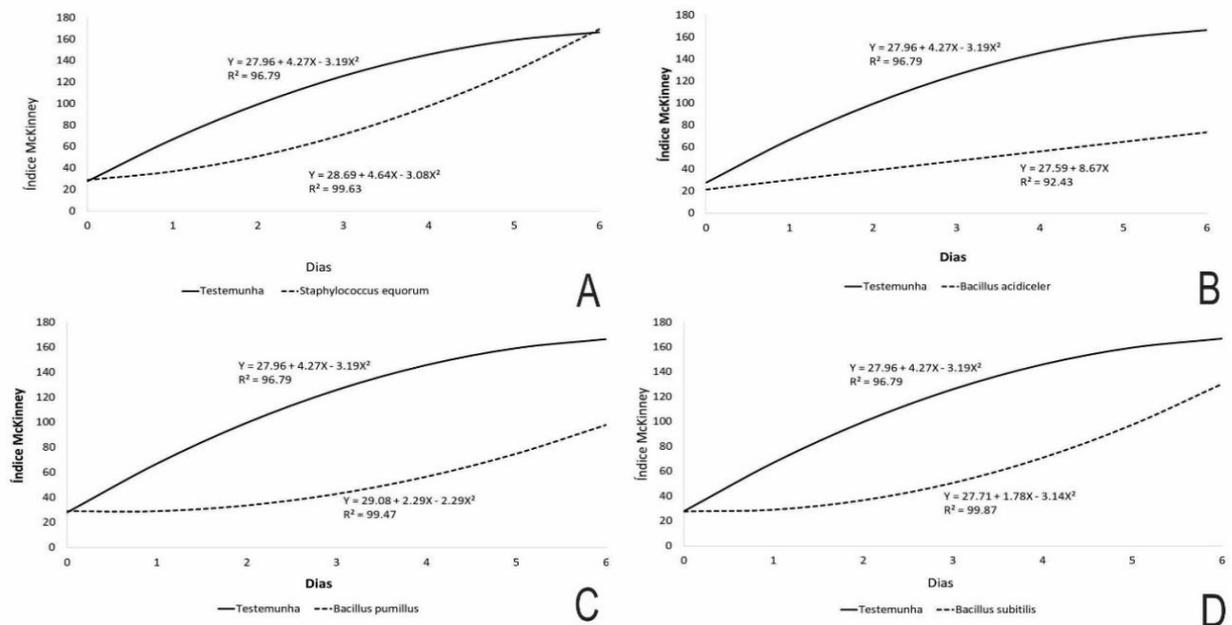
estabelecer uma competição por sítios de infecção e nutrientes, os chamados nichos de exclusão (BAE et al., 2016). Semelhante a isso, estirpes de bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir compostos como 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazina, pirrolnitrina, pioluteorina e cianeto de hidrogênio, que são antibióticos capazes de inibir o desenvolvimento de diversos patógenos de plantas (LANTEIGNE et al., 2012; WICAKSONO et al., 2018)

Com relação aos compostos voláteis, o *B. subtilis* teve desempenho semelhante ao *Bacillus acidiceler*, com alta taxa de inibição do crescimento do patógeno, com valores superiores a 58,81%. Os microrganismos *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* e *Staphylococcus equorum* apresentaram desempenho entre 27,28 e 35,86%, não diferindo entre si.

A produção de compostos voláteis desempenha papel essencial na atividade de antagonismo de muitos microrganismos endofíticos promotores de crescimento o que os fazem agir como potenciais agentes de controle de doenças em plantas. Compostos voláteis produzidos por estirpes de *Pseudomonas stutzeri* E25 e *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 como aqueles pertencentes ao grupo dos sufurados (S-metiltiobutirato, isobutil isotiocianato, 2-metiltioetanol e DMDS), podem ser os responsáveis pela inibição de crescimento de *B. cinerea* devido ao seu potencial já ter sido associado às atividades antimicrobianas (ROJAS-SOLÍS et al., 2018). Alguns microrganismos são capazes de produzir compostos voláteis como o 2-feniletanol, composto que está presente na natureza, principalmente no perfume de algumas flores e óleos essenciais, e que é letal para o desenvolvimento de alguns fitopatógenos, tendo capacidade de inibir a produção de aflatoxinas devido às alterações que esse composto pode causar na biossíntese de aminoácidos e proteínas nas mitocôndrias dos fungos e bactérias (CHANG et al., 2015; FARBO et al., 2018).

A aplicação das quatro bactérias que tiveram bom desempenho no controle *in vitro* de *Botrytis cinerea* também foram eficientes na pós colheita de rosas . A partir da curva de progresso da doença (Figura 1) constata-se a redução do desenvolvimento das lesões quando comparado com a testemunha (sem aplicação de bactérias) no qual apenas as hastes tratadas com a bactéria *S. equorum* apresentaram resultado similar a testemunha ao final do período de avaliação, mesmo tendo retardado o aparecimento dos sintomas iniciais. Comportamento que diverge das demais bactérias que retardaram o aparecimento de sintoma e inibiram o desenvolvimento da doença durante o período de avaliação.

**Figura 1.** Curvas de progresso da doença de *Botrytis cinerea* em rosa com e sem aplicação de bactérias, sendo: A – *Staphylococcus equorum*, B – *Bacillus acidiceler*, C – *Bacillus pumilus* e D – *Bacillus subtilis*.



Fonte: Do autor (2019)

Vários estudos indicam a eficiência de bactérias do gênero *Bacillus* na proteção de plantas contra fitopatógenos, algumas estirpes de espécies do gênero são capazes de produzir enzimas como a catalase, o qual são eficientes no controle de fitopatógeno como *Colletotrichum capsici*, causador de antracnose em pimentas e tomate (SRIKHONG et al., 2018). Essa capacidade antagonista da associação de plantas com bactérias do gênero *Bacillus* contra fitopatógeno se deve a presença de genes que codificam lipopeptídeos que são responsáveis por esse antagonismo, tal como a surfactina e a fengicina (MORA et al., 2015; VILLEGAS-ESCOBAR et al., 2018). Genes que decodificam a produção de surfactina, bacilisina, fengicina e subtilosina-A que possuem ação contra diversos microrganismos já foram identificados em algumas estirpes de *B. subtilis*. O efeito mais proeminente desses lipopeptídeos em patógenos é a sua capacidade de permeabilização da membrana na célula-alvo (THENNARASU et al., 2005; PATEL et al., 2011; ANDREES et al., 2019; LI et al., 2019).

A eficiência no controle do fitopatógeno em pós-colheita foi confirmada através da avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) e índice de McKinney de severidade da doença (Tabela 2). A AACPD foi menor para o *B. acidiceler*, *B. pumilus* e *B. subtilis* indicando menor desenvolvimento da doença ao longo do período de avaliação, da

mesma forma, o Índice de severidade foi menor nas hastes tratadas com essas três bactérias. Não ocorrendo diferença significativa entre a testemunha e o *S. equorum*.

**Tabela2.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e índice de McKinney para severidade da doença, avaliado aos 7 dias após o tratamento das rosas.

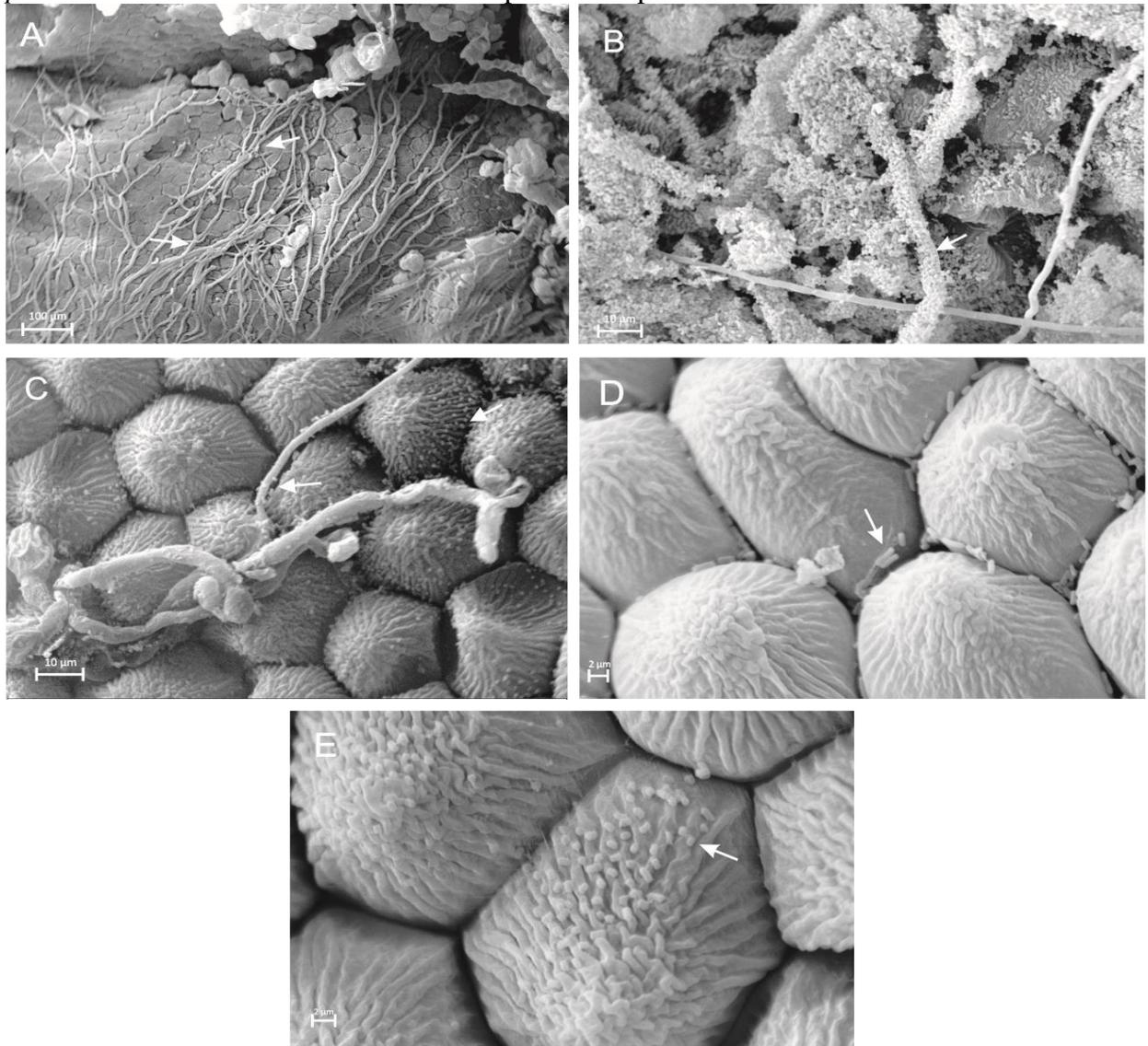
BACTÉRIA	AACPD	MCKINNEY
<i>Bacillus acidiceler</i>	10,00 a	76,18 a
<i>Bacillus pumilus</i>	9,83 a	99,99 a
<i>Bacillus subtilis</i>	11,48 a	108,09 a
<i>Staphylococcus equorum</i>	17,83 b	171,42 b
Testemunha	20,75 b	176,18 b
C.V. (%)	24,62	27,78

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si no teste Scott-Knott a 5%. Fonte: Do autor (2019)

Bactérias produzem grande número de compostos bioativos que são eficazes no controle de microrganismos. Estirpes de *B. pumilus* podem produzir compostos como a guanidina composto usado como pesticida e que possui capacidade nematicida, sendo comprovado sua eficiência no controle de nematoides, além de peptídeos classificados como P-1 e P-2 que são eficientes no controle de fungos e bactérias (LI et al., 2018; YAN et al., 2018).

A partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível constatar a interação das bactérias na superfície das pétalas da rosa (Figura 2). O crescimento das hifas do patógeno na superfície das pétalas ocorre de forma livre quando não há inoculação de (Figura 2 A), já em rosas inoculadas com bactérias há a interação delas com as hifas do patógeno (Figuras 2 B e C), essa interação pode ter sido mais eficaz para o controle da doença quando a inoculação ocorreu com as bactérias *B. acidiceler*, *B. pumilus* e *B. subtilis*, não tendo *S. equorum* sido tão eficiente quanto as demais. Da mesma forma, a colonização da superfície das pétalas pelas bactérias (Figura D e E) permaneceu até o final do experimento o que pode ter contribuído para a redução no desenvolvimento da doença, já que a produção de compostos inibitórios pela bactéria na superfície das pétalas pode ter desfavorecido a colonização destas pelo patógeno.

**Figura 2.** Eletromicrografia de varredura. A - Superfície da pétala de rosa sendo colonizada por *Botrytis cinerea*; B – *Staphylococcus equorum* colonizando hifas de *Botrytis cinerea*; C – *Bacillus acidiceler* colonizando hifas do patógeno e superfície da pétala; D e E – *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* colonizando superfície da pétala das rosas.



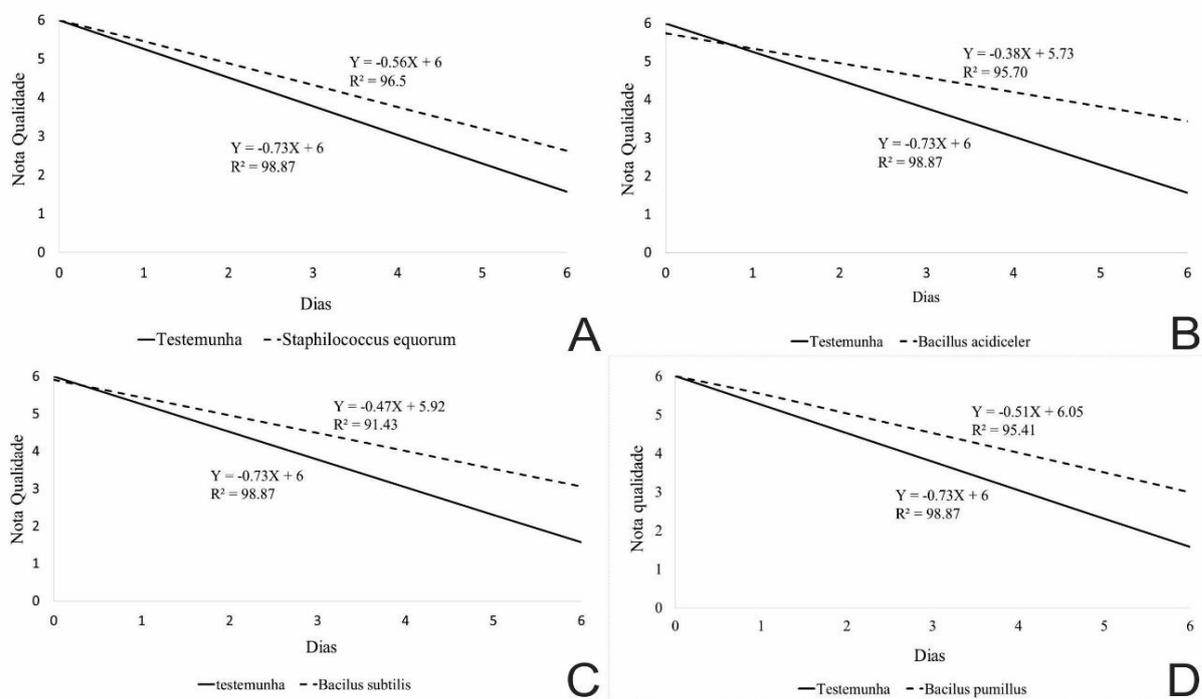
Fonte: Do autor (2019)

Diversos são os mecanismos de ação de microrganismos antagonistas no controle das doenças de plantas. Alguns microrganismos ao colonizarem os tecidos das plantas produzem compostos bioativos que funcionam como antibióticos. Além disso, a colonização de sítios de infecção pelos microrganismos antagonistas é um importante mecanismo de ação contra fitopatógenos, podendo ocorrer competição por espaço e nutrientes existentes nos sítios de infecção. A colonização endofítica ou da superfície das células pode diminuir as populações endofíticas e epifíticas dos patógenos ocasionando a redução dos sintomas de doença nas plantas. Alguns organismos podem colonizar células dos patógenos, como as hifas dos

fungos, e por meio da produção de enzimas hidrolíticas como amilase, celulase, lipase, pectinase, entre outras degradar as paredes das células correspondentes às estruturas de inoculação do patógeno (ROSÉLLO et al., 2017; PINTO et al., 2018; DANARAS et al., 2019).

O tratamento das rosas com bactérias aumentou a durabilidade delas, havendo redução da qualidade visual apenas nas rosas que foram tratadas com *S. equorum*. Esse aumento de durabilidade das bactéria do gênero *Bacillus* indica que além do controle da doença em pós-colheita, a aplicação delas pode levar a uma menor perda da qualidade e maior durabilidade para comercialização (Figura 3).

**Figura 3.** Durabilidade de rosas tratadas com bactérias. A – *Staphilococcus equorum*, B – *Bacillus acidiceler*, C - *Bacillus subtilis* e D – *Bacillus pumilus*.



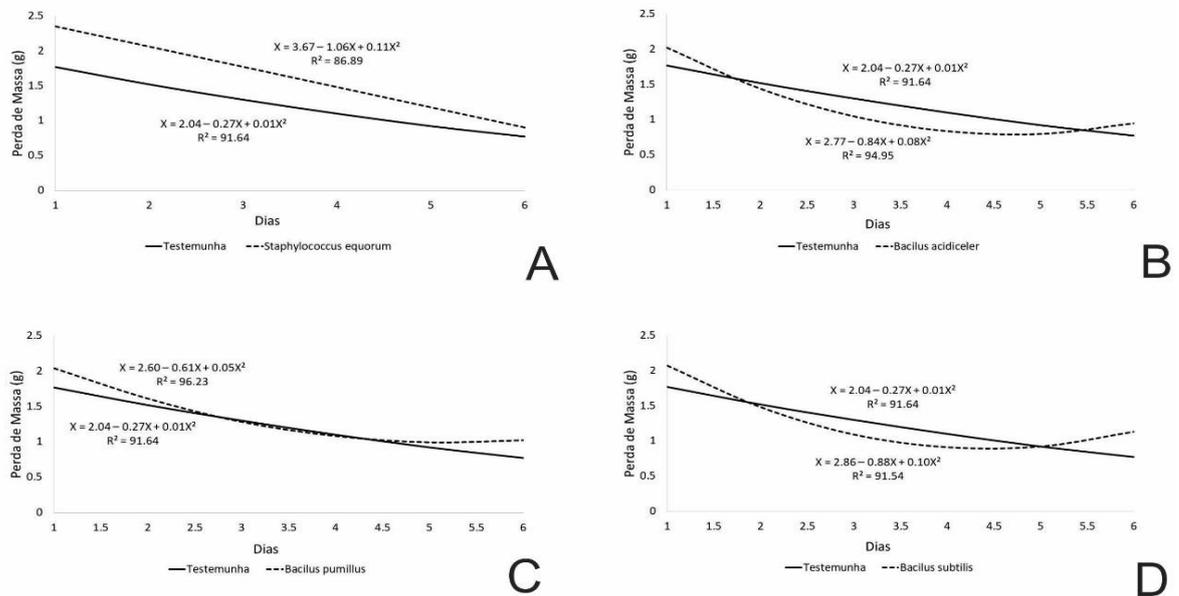
Fonte: Do autor (2019)

O crescimento de microrganismos nos vasos das hastes cortadas pode levar à oclusão dos vasos condutores e, com isso, acarretar um processo de senescência mais rápido, o que desvaloriza o produto. Porém, o uso de microrganismos que possam atuar no controle biológico pode auxiliar no controle dos microrganismos não benéficos que causam o entupimento desses vasos devido ao controle de suas populações, podendo acarretar em maior durabilidade das flores (CARLSON et al., 2015).

Houve variação na perda de massa das hastes ao longo dos dias (Figura 4). A perda de massa das rosas tratadas com *S. equorum* se comportou de forma linear, indicando perda constante da massa fresca, o que sugere que as flores tratadas com esse microrganismo entrou

em estado de senescência mais rápido que os demais. Já as flores tratadas com os outros microrganismos mostraram redução inicial na perda de massa seguido de aumento da mesma, indicando que houve retardo no período de senescência.

**Figura 4.** Perda de massa de hastes de rosas tratadas com bactérias. A – *Staphylococcus equorum*, B – *Bacillus acidiceler*, C – *Bacillus subtilis* e D – *Bacillus pumilus*.



Fonte: Do autor (2019)

A perda de massa de flores acima de 10% do seu peso pode reduzir a longevidade, uma vez que isso pode significar a murcha das hastes (SANGALLI et al., 2007). O retardo inicial da perda de massa pode estar relacionado a influência da bactéria em fatores como a diminuição da transpiração, além da ação inibitória sobre outros microrganismos que poderiam favorecer processos de deterioração das hastes florais (BRACKMANN et al., 2000; PIETRO et al., 2012). A proliferação de bactérias nos vasos condutores também pode reduzir a durabilidade de algumas flores de corte, como as rosas, devido à diminuição da condutância hidráulica por meio de oclusão vascular das hastes e por utilizar os carboidratos solúveis armazenados nestas para seu desenvolvimento, o que pode limitar o crescimento dos botões florais e afetar a sua durabilidade. Esses carboidratos são substrato necessários para a respiração das flores, além de ser componente da parede celular e pigmentos, podendo ser sinalizadores da expressão de alguns genes presentes em flores e auxiliar na pressão de turgescência nas células das pétalas, aumentando a pressão de água que podem retardar a senescência (NORIKOSHI et al., 2016, AZUMA et al., 2019).

A durabilidade das rosas tratadas com *B. acidiceler*, *B. subtilis* e *B. pumilus* foi superior que as demais mostrando interação positiva dos tratamentos com a qualidade das flores (Tabela 3).

**Tabela 3.** Durabilidade e perda de massa de rosas tratadas com bactérias.

BACTÉRIAS	DURABILIDADE (dias)	PERDA DE MASSA (%)
<i>Bacillus acidiceler</i>	6 a	32.79 a
<i>Bacillus subtilis</i>	6 a	33.59 a
<i>Bacillus pumilus</i>	6 a	33.26 a
<i>Staphylococcus equorum</i>	5 b	39.20 a
Testemunha	4 b	33.80 a
C. V. (%)	16.81	16.07

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si no teste Scott-Knott a 5%. Fonte: Do autor (2019)

A aplicação de agentes que controlem a proliferação de microrganismos indesejados pode auxiliar na durabilidade das hastes cortadas, assim, a aplicação exógena de bactérias em flores de corte já foi associada com o retardo da senescência de folhagens, aumento da durabilidade de botões florais, além de acarretar o aumento do consumo de água devido a interação destas com os botões florais (BASHIR et al., 2019). Embora a aplicação dos agentes favoreça processos essenciais para a manutenção da durabilidade pós colheita, algumas flores de corte, como os lírios e tulipas, podem não responder à esses tratamentos, não alterando o seu balanço hídrico, sugerindo maior tolerância quanto à esses microrganismos (AZUMA et al., 2019).

#### 4. CONCLUSÃO

As bactérias *Bacillus acidiceler*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* foram eficientes no controle de *Botrytis cinerea* na pós-colheita de rosas vermelhas cultivar Tonight e aumentaram a durabilidade das hastes florais.

#### 5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem também ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA por ceder os equipamentos para as análises.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, D.B., FRIKHA-GARGOURI, O., TOUNSI, S. Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* strain 32a. *Biological Control*, v.124, n. 2, p. 61-67, 2018.
- ALVES, E. Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. Lavras, MG: UFLA, 2005.
- ANDREES, H.; HAIDER, M.S.; ANJUM, T.; AKRAM, W. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop Protection*, v. 115, n. 12, p. 75-83, 2019.
- ARAÚJO, A. E. Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores do ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. 1995. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Viçosa, Viçosa, 1995.
- AZUMA, M.; ONOZAKI, T.; ICHIMURA, K. Effects of bacterial proliferation and soluble carbohydrate levels on the vase life of cut dahlia (*Dahlia variabilis*) Flowers. *The Horticulture Journal*, v. 88, n. 1, p. 106–115, 2019.
- BAE, S.J.; MOHANTA, T.K; CHUNG, J.Y.; RYU, M.; PARK, G; SHIM, S.; HONG, S.; SEO, H.; BAE, D.; BAE, I.; KIM, J.; BAE, H. Trichoderma metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens, *Biological Control*, v. 92, p. 128–138, 2016.
- BASHIR, M.; ASIF, M.; NAVEED, M.; QADRI, R.W.K.; FARIED, N.; ANJUM, F. POSTHARVEST Exogenous application of various bacterial strains improves the longevity of cut ‘royal virgin’ tulip flowers, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, v. 56, n.1, p. 71-76, 2019.
- BRACKMANN A; BELLÉ RA; VIZZOTTO M; LUNARDI R. Armazenamento de crisântemos (*Dedranthema grandiflora* cv. Red refocus) em diferentes temperaturas e soluções conservantes. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, p. 19-23, 2000.
- CAPDEVILLE, G.; MAFFIA, L. A.; FINGER, F. L.; BATISTA, U. G. Pre-harvest calcium sulfate applications affect vase life and severity of gray mold in cut roses. *Scientia Horticulture*, v. 103, n. 3, p. 329-338, 2005.
- CARLSON, A.S.; DOLEA, J.M.; MATTHYSSE, A.G.; HOFFMANN, W.A.; KORNEGAYA, J.L. Bacteria species and solution pH effect postharvest quality of cut *Zinnia elegans*. *Scientia Horticulturae*, v. 194, p. 71–78, 2015.
- CHANG, P.K., HUA, S.S.T., SARREAL, S.B.L., LI, R.W., Suppression of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. *Toxins*, v. 7, p. 3887–3902, 2015.
- DARANAS, N.; ROSELLÓ, G.; CABREFIGA, J.; CABREFIGA, J.; DONATI, I.; FRANCÉS, J.; BADOSA, E.; SPINELLI, F.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology*, v. 174, p. 92–105, 2019.

- FARBO, M.G.; URGEGHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; SAMIR JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, *International Journal of Food Microbiology*, v. 284, p. 1–10, 2018.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a guide for bootstrap procedures in multiple comparisons. *Cienc Agrotec*, v. 38, p. 109–112, 2014.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. *Ornamental Horticulture, Campinas*, v. 23, n. 2, p 178-184, 2017.
- LANTEIGNE, C.; GADKAR, V.J.; WALLON, T.; NOVINSKAK, A.; FILION, M. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, v. 102, p. 967–973, 2012.
- LI, L.; TAN, J.; CHEN, F. *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 shows nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* via the production of a guanidine compound. *Biocontrol Science and Technology*, v. 28, n. 12, p. 1128-1139, 2018.
- LI, Q.; LIAO, S.; ZHI, H.; XING, D.; XIAO, Y.; YANG, Q. Characterization and sequence analysis of potential biofertilizer and biocontrol agent bacillus subtilis strain sem-9 from silkworm excrement. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 65, n. 1, p. 45-58, 2019.
- LI, Z.; WANG, T.; LUO, X.; LI, X.; XIA, C.; ZHAO, Y.; YE, X.; HUANG, Y.; GU, X.; CAO, H.; CUI, Z.; FAN, J. Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum*, *Biological Control*, v. 126, p. 36–44, 2018.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v. 26, p.195–218, 1923.
- MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS ONE*, v.1, 21 p., 2015.
- NORIKOSHI, R.; SHIBATA, T.; NIKI, T.; ICHIMURA, K. Sucrose treatment enlarges petal cell size and increases vacuolar sugar concentrations in cut rose flowers. *Postharvest Biology and Technology*, v. 116, p. 59–65, 2016.
- PATEL, H.; TSCHEKA, C.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; HEERKLOTZ, H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochemistry and Biophysics Acta.*, v. 1808, n. 8, p. 2000-2008, 2011.
- PIETRO, J.; MATTIUZ, B.H.; MATTIUZ, C.F.M.; RODRIGUES, T.J.D. Manutenção da qualidade de rosas cortadas cv. Vega em soluções conservantes. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p. 64-70, 2012.
- PINTO, C.; CUSTÓDIO, V.; NUNES, M.; SONGY, A.; RABENOELINA, F.; COURTEAUX, B.; CLÉMENT, C.; GOMES, A.C.; FONTAINE, F. Understand the potential

role of *aureobasidium pullulans*, a residente microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in microbiology*, v. 9, 15 p., 2018.

ROJAS-SOLÍS, D.; ZETTER-SALOMÓN, E.; CONTRERÁS-PÉREZ, M.; ROCHA-GRANADOS, M.C.; MACÍAS-RODRIGUEZ, L.; SANTOYO, G. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v 13, p. 46-52, 2018.

ROSA, M. M. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010.

ROSELLÓ, G.; FRANCÉS, J.; DARANAS, N.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Control of fire blight of pear trees with mixed inocula of two *Lactobacillus plantarum* strains and lactic acid. *Journal of Plant Pathology*, v. 99, p. 111-120, 2017.

SANGALLI A; SCALON SPQ; CARVALHO JCL. Perda de massa de flores de capuchinha após armazenamento. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p. 471-474, 2007.

SRIKHONG, P.; LERTMONGKONTHUM, K.; SOWANPREECHA, R.; RERNGSAMRAN, P. *Bacillus* sp. strain M10 as a potential biocontrol agent protecting chili pepper and tomato fruits from anthracnose disease caused by *Colletotrichum capsica*. *BioControl*, v. 63, p. 833–842, 2018.

THENNARASU, S.; LEE, D.K.; POON, A.; KAWULKA, K.E.; VEDERAS, J.C.; RAMAMOORTHY, A. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chemistry and Physics of Lipids.*, v. 137, n. 1-2, p. 38-51, 2005.

VIEIRA, B.S. Potencial antagonístico do isolado bacteriano (BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. *Revista Ciência Agrícola*, v. 14, n. 1, p. 59–66, 2017.

VILLEGAS-ESCOBAR, V.; GONZÁLEZ-JARAMILLO, L.M; RAMÍREZ, M.; MONCADA, R.N.; SIERRA-ZAPATA, L.; ORDUZ, S.; ROMERO-TABAREZ, M. Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*, *Biological Control*, v. 125, p. 20–28, 2018.

WICAKSONO, W.A.; JONES, E.E.; CASONATO, S.; MONK, J.; RIDGWAY, H.J. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant. *Biological Control*, v. 116, p. 103–112, 2018.

WILLIAMSON, B.; DUNCAN, G. H.; HARRISON, J. G.; HARDING, L. A.; ELAD, Y.; ZIMAND, G. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, n. 99, v.11, p. 1303–1310, 1995.

YAN, H.; YUN, J.; AI, D.; ZHANG, W.; BAI, J.; GUO, J. Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 21, p. 21, 2018.

**ARTIGO 2: Bactérias promotoras de crescimento na produção e composição química dos óleos essenciais de rosas**

Neilton Antonio Fiusa Araújo; Rafaela Magalhães Brandão; Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira; Eduardo Alves, Moacir Pasqual, Joyce Dória

(Preparado segundo normas NBR 6023)

## RESUMO

Os óleos essenciais são compostos aromáticos extraídos de plantas. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ficando atrás da Índia, China e Indonésia. O óleo essencial de rosa é rico em compostos terpênicos e sesquiterpênicos, que são bastante explorados pela indústria farmacêutica e cosmética, principalmente por sua capacidade antioxidante. No Brasil a produção de rosas ocupa a primeira posição entre as flores de corte, correspondendo a 30 % do mercado nacional. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho selecionar bactérias eficientes para a produção, além de avaliar sua influência na produção dos óleos essenciais de rosas. No experimento foram avaliadas sete bactérias as quais foram avaliadas quanto ao potencial de promoção de crescimento *in vitro*, sendo testadas quanto à fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de protease e produção de auxina. Das bactérias testadas, quatro foram selecionadas com base nos resultados dos testes de promoção de crescimento e inoculadas em plantas de roseira cultivar Príncipe Negro para avaliação da influência na produção e extração de óleos essenciais. A avaliação da produção foi feita através das características das hastes florais (tamanho, peso e diâmetro da haste) e características do botão floral (diâmetro do botão aberto e fechado e peso do botão destacado). Os óleos essenciais das flores inoculadas com cada bactéria foram extraídos por hidrodestilação e avaliados quanto ao teor, rendimento e composição química. A aplicação das bactérias *Bacillus acidiceler* e *Bacillus pumilus* aumentaram o tamanho da flor e das hastes florais. O *Bacillus pumilus* também aumentou o peso das pétalas frescas e o rendimento do óleo essencial, alterando de a composição química do óleo essencial extraído. Sendo assim, concluem-se que o *Bacillus pumilus* e o *Bacillus subtilis* melhoraram a produção das rosas. Já o *Bacillus pumilus* aumentou o teor de óleo essencial bem como alterou de forma positiva a composição química do óleo essencial extraído.

**Palavras-chaves:** Teor. Rendimento. *Bacillus*.

## ABSTRACT

Essential oils are aromatic compounds extracted from plants. Brazil has a prominent place in essential oils production, behind India, China and Indonesia. Rose essential oil is rich in terpenic and sesquiterpene compounds, which are widely exploited by pharmaceutical and cosmetic industry, especially for their antioxidant capacity. In Brazil, rose production ranks first among cut flowers, accounting for 30% of the national market. Thus, the aim of this work was to select efficient bacteria for production, besides evaluating their influence on rose essential oils production. In experiment, seven bacteria were evaluated for in vitro growth promotion potential, being tested for nitrogen fixation, phosphate solubilization, protease production and auxin production. Of the bacteria tested, four were selected based on the results of the growth promotion tests and inoculated in rosemary cultivar “Príncipe Negro” plants to evaluate the influence on the production and extraction of essential oils. The evaluation of production was made through the characteristics of the floral stems (size, weight and diameter of the stem) and characteristics of the floral bud (open and closed bud diameter and detached bud weight). The essential oils of flowers inoculated with each bacterium were extracted by hydrodistillation and evaluated for content, yield and chemical composition. The application of *Bacillus acidiceler* and *Bacillus pumilus* bacteria increased the size of the flower and flower stems. *Bacillus pumilus* also increased the weight of fresh petals and essential oil yield by changing the chemical composition of extracted essential oil. Thus, it is concluded that *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* improved the production of roses. *Bacillus pumilus* increased the essential oil content as well as positively altered the chemical composition of the extracted essential oil.

**Keywords:** Content. Yield. *Bacillus*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos aromáticos extraídos de plantas, que são comumente utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, devido a sua composição química, pois algumas substâncias presentes em sua constituição possuem alto valor comercial. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ficando atrás da Índia, China e Indonésia, principalmente pela produção e importação de óleos essenciais extraídos de frutas cítricas (BIZZO et al., 2009). O óleo essencial de rosa é rico em compostos terpênicos e sesquiterpênicos, bastantes explorados pela indústria farmacêutica e cosmética, principalmente por sua capacidade antioxidante (PATRASCU et al., 2016).

No Brasil a produção de rosas ocupa a primeira posição entre as flores de corte, correspondendo a 30 % do mercado nacional (JUNQUEIRA & PEETZ, 2017). Porém, um dos problemas enfrentados para a aquisição desse óleo essencial é o baixo rendimento por planta, sendo necessário o uso de técnicas de extração que aumentem o rendimento por flor ou manejo durante o cultivo que estimule à produção pela planta (PATRASCU et al., 2016).

Microrganismos eficientes são aqueles utilizados com as mais diversas finalidades e que são capazes de proporcionar benefícios ao homem. Na agricultura, o uso desses microrganismos tem influenciado o crescimento e desenvolvimento das plantas, estimulando o aumento da produção, auxiliando no controle de pragas e doenças e ativando enzimas capazes de produzir compostos que melhoram a qualidade dos produtos obtidos por plantas inoculadas com eles. Os microrganismos promotores de crescimento podem influenciar também a produção de compostos secundários pelas plantas, já que muitos deles possuem a capacidade de produzir hormônios como auxinas, citocininas e giberelinas ou mesmo melhorar a absorção de nutrientes como o nitrogênio e fósforo, o que afeta diretamente a produção e qualidade dos óleos essenciais de plantas (GLICK, 2012; YOUNIS et al., 2015).

Entre os microrganismos eficientes mais utilizados estão as bactérias. Estudos indicam que bactérias são capazes de auxiliar as plantas tanto no seu desenvolvimento, como são capazes de estimular a produção de compostos que auxiliam na defesa vegetal, como é o caso da produção de metabólitos secundários responsáveis pelo sistema de defesa da planta à fatores externos, o que pode influenciar na composição química de seus compostos aromáticos, como os óleos essenciais (XIE et al., 2019). Assim, objetivou-se com este trabalho selecionar bactérias promotoras de crescimento para a cultura da roseira, além de avaliar sua influência na produção dos óleos essenciais de rosas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Aquisição das bactérias e isolamento do patógeno

As bactérias utilizadas foram isoladas a partir de plantas de morangueiro e as demais adquiridas da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação e origem das bactérias.

<b>CÓDIGO</b>	<b>BACTÉRIA</b>	<b>SUBSTRATO</b>
<b>CCMA 0057</b>	<i>Bacillus acidicer</i>	Fruto de Pimenta do mato
<b>CCMA 0084</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fruto de Ananás
<b>CCMA 0058</b>	<i>Bacillus macauenses</i>	Fruto de Pimenta do Mato
<b>132</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Fruto de Morangueiro
<b>CCMA 0098</b>	<i>Bacillus pumilus</i>	Fruto de Pequi
<b>121</b>	<i>Pantoea ananatis</i>	Folha de Morangueiro
<b>44</b>	<i>Staphylococcus equorum</i>	Raiz de Morangueiro

Fonte: Do autor (2019)

### 2.2. Produção de protease

A produção de protease foi determinada pelo método de Sgroy et al. (2009). Placas de Petri com meio de cultura Ágar Leite Desnatado (SMA) foram inoculadas com 10 µL dos isolados bacterianos cultivados previamente em meio Luria-Bertami (LB) e incubadas a 28°C. A formação de halos ao redor das colônias foi observada depois de 24h após a inoculação.

### 2.3. Produção de auxina

Para determinação da produção de auxinas foram utilizadas culturas das bactérias ativadas em placas de Petri com meio 523 por 24 h. As colônias das bactérias foram passadas para um microtubo contendo 1 mL de caldo nutriente acrescido de 0.1 g L<sup>-1</sup> de L-triptofano, deixando em agitação por 3 dias no escuro. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 1500 rpm por 3 minutos e retirou-se uma alíquota de 0.5 mL que foi acrescida com 0.5 mL de reagente de Salkowski. A reação foi incubada por 15 min no escuro, e então foi observado a ocorrência de uma coloração rosa ou avermelhada, significando presença de auxinas.

## **2.4. Teste de solubilização de fosfato**

Neste teste as bactérias foram ativadas com 24 horas de antecedência. Placas contendo o meio NBRIP (glicose (10 g),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5 g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,25 g), KCl (0,2 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1 g), ágar (15 g)) (Nautiyal, 1999), foram inoculadas com 10  $\mu\text{L}$  dos isolados bacterianos cultivados em meio líquido 523, então foram incubadas a 28°C, fotoperíodo de 12 h e observou-se a formação de halos ao redor das colônias depois de 24h após a inoculação.

## **2.5. Teste de fixação biológica de Nitrogênio**

Este teste foi realizado em frascos de 10 mL contendo 5 mL de meio NFB semi-sólido, constituído por ácido málico (5 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g), NaCl (0,1 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g), solução de vitaminas (1 mL), solução de micronutrientes (2 mL), FeEDTA (4 mL), Azul de Bromotimol (2 mL), KOH (4,5 g), ágar (2 g) e pH 6,8 (DOBEREINER et al., 1995). Bactérias com 24 h de crescimento, cultivadas em meio 523 foram inoculadas no meio com auxílio de uma alça de inoculação, por meio do qual foram coletadas as bactérias e feito a perfuração do meio NFB. Em seguida, foram incubados a 28°C, sendo então possível observar a formação de halos na parte superior do meio de cultivo, indicando a fixação do nitrogênio pelas bactérias.

## **2.6. Efeito de bactérias na produção de rosas**

De acordo com os testes de promoção de crescimento, foram selecionadas 4 bactérias que apresentaram os melhores resultados nas avaliações para visualizar o efeito delas na produção de rosas.

As espécies bacterianas selecionadas foram inoculadas em roseiras da cultivar Príncipe Negro. Para inoculação, as plantas foram podadas a 30 cm do local de enxertia, retiradas dos vasos e suas raízes lavadas até a completa exposição.

Para o preparo da suspensão, as bactérias foram cultivadas por 48 h em caldo nutriente e a concentração de cada suspensão foi ajustada para  $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . A inoculação das plantas foi feita por imersão das raízes nuas na suspensão por 1 hora. Decorrido esse tempo, as mudas foram plantadas em vasos com capacidade de 10 L, contendo substrato comercial Topstrato®. Foram utilizados 5 tratamentos, correspondendo a cada bactéria selecionada e

uma testemunha que correspondeu a plantas inoculadas apenas com água destilada. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados com 5 repetições, onde a unidade experimental consistiu de 4 plantas por bloco.

As avaliações de produção foram feitas a partir da primeira produção de rosas, onde as flores foram colhidas no ponto de colheita. As características fitotécnicas avaliadas foram diâmetro do botão fechado, diâmetro da flor em ponto de colheita, tamanho da haste, diâmetro da haste, peso da haste e peso total das pétalas destacadas por flor.

## **2.7. Produção de óleo essencial de rosas**

O óleo essencial das rosas foi extraído a partir de flores no ponto de colheita. Foram pesadas 100 g de pétalas frescas e levadas para estufa com circulação de ar para secagem a 30 °C. Após a secagem foram novamente pesadas e o óleo foi extraído por hidrodestilação por um período de 4 h.

Os óleos essenciais foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). As extrações foram realizadas em triplicata. Posteriormente à extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato por processo de partição com pentano. A parte orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada para a eliminação do solvente. O óleo essencial sem resíduos de solvente ficou armazenado ao abrigo de luz e calor.

## **2.8. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais**

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da UFLA. Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram caracterizados por CG / EM (Shimadzu, QP5050A) sob as seguintes condições: coluna capilar sílica fundida com fase ligada a DB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura de 0,25 µm); temperatura programada de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C / min e de 240 °C a 300 °C a 10 °C / min, onde foi mantida constante por 7 min; temperatura do injetor de 220 °C; gás de arraste: hélio; injeção de 0,1 µL de óleos essenciais diluídos em hexano a 1: 100 v/v). Utilizando uma temperatura do espectrômetro de massas de 240 °C, nas seguintes condições: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e

fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da. A quantificação de compostos voláteis foi determinada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID) (Shimadzu CG-17A), sob as mesmas condições da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), com exceção da temperatura do detector que foi de 300 °C. O índice de retenção foi calculado para todos os constituintes voláteis nos óleos essenciais, utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>). Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de massa, com até 95% de similaridade, com aqueles presentes nas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21 e confirmados pelos índices de retenção segundo Adams (2007).

## 2.9. Rendimento e teor dos óleos extraídos

Para o cálculo de rendimento e teor dos óleos extraídos, frascos âmbar foram pesados vazios e pesados novamente após a evaporação do hexano à temperatura ambiente. A diferença de pesos determinou a quantidade de óleo extraída. Com esses valores, foi determinado o rendimento para cada tratamento e o teor dos óleos essenciais foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (SANTOS et al. 2004):

$$(\text{Teor do óleo (\%)} = [\text{Peso do óleo (g)} \times \text{Biomassa de pétalas seca}] / 100)$$

## 2.10. Análise estatística dos dados obtidos

Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade e então submetidos à ANAVA aplicando o teste de Scott-Knott a 5% para comparação múltipla de médias, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de promoção de crescimento mostraram que as estirpes utilizadas das bactérias *Bacillus acidiceler*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Staphylococcus equorum* foram eficientes nos testes de solubilização de fosfato, produção de protease e fixação de nitrogênio (Tabela 2). A estirpe de *Bacillus amyloliquefacies* foi eficiente para solubilização de fosfato e produção de protease e as estirpes de *Bacillus macauenses* e *Pantoea ananatis* foram eficientes apenas na solubilização de fosfato e

produção de protease, respectivamente. Nenhuma das estirpes das bactérias utilizadas mostrou capacidade de produção de auxinas pelo teste avaliado.

**Tabela 2.** Teste de produção de compostos bioquímicos por bactérias, avaliação da solubilização de fosfato, produção de protease, fixação biológica de nitrogênio e produção de auxinas.

BACTÉRIAS	FOSFATO	PROTEASE	NITROGÊNIO	AUXINA
<i>Bacillus acidiceler</i>	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	-	-
<i>Bacillus macauenses</i>	+	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-
<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+	-
<i>Pantoea ananatis</i>	-	+	-	-
<i>Staphylococcus equorum</i>	+	+	+	-

(+) reação positiva e (-) reação negativa. Fonte: Do autor (2019)

A solubilização do fosfato é um mecanismo comum a muitos microrganismos que se associam às raízes de plantas, o qual essa capacidade de solubilização pode se relacionar com a diminuição do pH do meio devido à produção de ácidos orgânicos, tais como o ácido glucônico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido succínico, dentre estes sendo mais comum a formação do ácido glucônico, os quais podem dissolver o fosfato mineral como resultado de troca de ânions ou quelatizar íons associados com o fosfato (CHAGAS JÚNIOR et al., 2010; TENGA et al., 2019). A acidificação do meio é correlacionada com a solubilização do fósforo pela atividade da fosfatase ácida, indicando que alguns microrganismos desenvolveram enzimas capazes de liberar fosfato inorgânico dos complexos de organofosfato, além da atividade dessa enzima se mostrar boa indicadora para a mineralização do fósforo orgânico (KUMAR, 2016; TENGA et al., 2019). Da mesma forma, a capacidade de fixação de nitrogênio é comum a muito grupos de microrganismos e sua associação devido ao seu potencial benéfico tem sido estudado para aplicação nas mais variadas culturas agrícolas (MONDANI et al., 2019; SCHMIDT et al., 2019)

Com relação à produção das rosas, a aplicação das bactérias não influenciou no tamanho do botão antes da abertura da flor (Tabela 3), porém, plantas tratadas com *B. acidiceler*, *B. subtilis* e *B. pumilus* apresentaram maior diâmetro de flor aberta. Também foi observado aumento do peso das pétalas das plantas tratadas com *B. pumilus*, evidenciando um efeito positivo dessa bactéria em relação as outras avaliadas.

**Tabela 3.** Efeito de bactérias promotoras de crescimento sobre o diâmetro do botão, diâmetro da flor e peso das pétalas de rosas da cultivar Príncipe Negro

BACTÉRIAS	Diâmetro do Botão (mm)	Diâmetro da Flor (mm)	Peso das Pétalas (g)
<i>Bacillus acidiceler</i>	*30,68 a	61,10 a	8,56 b
<i>Bacillus subtilis</i>	31,66 a	58,48 a	8,43 b
<i>Bacillus pumilus</i>	27,16 a	65,41 a	15,89 a
<i>Staphylococcus equorum</i>	28,93 a	50,68 b	7,76 b
Testemunha	29,05 a	51,38 b	9,00 b
C.V. (%)	12,50	16,01	24,33

\*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2019)

Algumas bactérias promotoras de crescimento podem interferir na produção de hormônios pelas plantas, o que pode afetar a estrutura das raízes, aumentando a sua superfície de área, número de pelos radiculares e tipo de raízes. Além desses fatores, a inoculação com bactérias endofíticas pode promover o aumento da fotossíntese, induzindo maior produção de carboidratos pelas plantas. Em rosas, o acúmulo de carboidratos nas hastes florais pode favorecer a durabilidade das flores na pós-colheita. Dessa forma, a aplicação de microrganismos endofíticos que auxiliam no acúmulo de carboidratos nas hastes florais podem melhorar a qualidade final das rosas, levando à maior durabilidade das hastes cortadas (MOUBAYIDIN et al., 2009; WANG et al., 2014; CASTANHEIRA et al., 2017; WANG et al., 2019).

Plantas tratadas com *B. acidiceler* e *B. pumilus* apresentaram maior tamanho de haste (Tabela 4). O diâmetro das hastes produzidas foi menor em plantas tratadas com *S. equorum* e *B. pumilus*, mas apenas plantas tratadas com *S. equorum* apresentaram o menor peso das hastes florais.

**Tabela 4.** Efeito de bactérias promotoras de crescimento no tamanho da haste, diâmetro da haste e peso da haste de rosas da cultivar Príncipe Negro

BACTÉRIAS	Haste (cm)	Diam. Haste (mm)	Peso haste (g)
<i>Bacillus acidiceler</i>	*67,62 a	4,15 a	14,18 a
<i>Bacillus subtilis</i>	60,86 b	4,57 a	16,14 a
<i>Bacillus pumilus</i>	67,01 a	3,88 b	15,14 a
<i>Staphylococcus equorum</i>	54,32 b	3,35 b	10,94 b
Testemunha	57,50 b	4,74 a	16,84 a
C.V. (%)	10,06	23,28	22,14

\*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si no teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2019)

O rendimento do óleo extraído das rosas tratadas com *B. pumilus* apresentou superioridade em relação as outras bactérias. Contudo, foi observado efeito negativo no rendimento das plantas tratadas com *B. acidiceler*, onde o teor de óleo também foi menor em

plantas tratadas com essa bactéria, não havendo diferença no teor de óleo entre as plantas tratadas com as demais bactérias e a testemunha (Tabela 5). Porém, não foi possível obter quantidade de óleo essencial suficiente para realização da análise nas rosas tratadas com a bactéria *S. equorum* através da metodologia utilizada para extração.

A secagem do material pode levar a decréscimos no teor de óleos essenciais e mudanças em sua composição. Embora a secagem por liofilização seja indicada devido a menor perda na quantidade de óleo essencial, algumas espécies podem apresentar maior conteúdo de óleos essenciais quando submetidas a processo de secagem convectivas (PIRBALOUTI et al., 2013; ROSLON et al., 2016).

**Tabela 5.** Efeito de bactérias promotoras de crescimento no Rendimento e Teor de óleo essencial de rosas cultivar Príncipe Negro

Bactérias	Rendimento do óleo	Teor do óleo (%)
<i>Bacillus acidiceler</i>	0,0120 c	0,065 b
<i>Bacillus subtilis</i>	0,0142 b	0,076 a
<i>Bacillus pumilus</i>	0,0152 a	0,078 a
Testemunha	0,0137 b	0,074 a
C. V. (%)	3,32	5,27

\* Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2019)

Além da solubilização de fosfato e da fixação de nitrogênio, os microrganismos promotores de crescimento podem ser capazes de produzir fitormônios, sideróforos e antibióticos, sendo também capazes de induzir a resistência sistêmica na planta (SGROY et al., 2009). Além disso, as plantas também podem reagir à interação com esses organismos através do aumento do seu crescimento, pois o aumento da quantidade dos óleos essenciais muitas vezes se relaciona com o crescimento dos órgãos vegetais devido a maior absorção de nutrientes e a qualidade dos óleos sendo influenciada pela ativação de rotas metabólicas devido a interação da planta com os microrganismos (MAJI et al., 2013; SINGH et al., 2019)

Estirpes de *B. subtilis* tem o potencial de estimular a produção de biomassa de plantas até mesmo sob condições de campo adversas, como em solos salinos, e aumentar a produção de clorofila e o conteúdo de proteínas solúveis (Wang et al., 2018). Além disso, a aplicação de estirpes de *B. subtilis* influenciou positivamente no crescimento e produção de culturas como o algodoeiro, capim braquipódio (*Brachypodium distachyon*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) e trigo (*Triticum aestivum*) (ALI, 2015; GAGNÉ-BOURQUE et al., 2015; WANG et al., 2018; ANDREES et al., 2019).

Para a composição química dos óleos essenciais das rosas houve diferença significativa de acordo com cada bactéria utilizada no tratamento das plantas (Tabela 6). O menor número de componentes encontrado apareceu nos óleos de plantas tratadas com o *B.*

*acidiceler*, porém, plantas tratadas com *B. pumilus* e *B. subtilis* apresentaram maior número de componentes, nos quais os componentes químicos óxido de carofileno,  $\alpha$ -Selineno, Limoneno,  $\alpha$ -Farneseno apareceram somente nas plantas tratadas com *B. pumilus* e o Teaspirano somente nas flores tratadas com *B. subtilis*.

**Tabela 6.** Efeito de bactérias promotoras de crescimento na composição química do óleo de rosas cultivar Príncipe Negro extraído por hidrodestilação.

Constituintes	IR tab	% de Área			
		Testemunha	<i>B. acidiceler</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
Myrtanol	1258	2,6654	-	-	1,2507
Ácool cetil	1874	36,5107	18,6024	25,3024	21,861
Eicosane	2000	34,7354	23,1142	-	1,3856
6- Ácido Hexadecanóico	1959	2,2855	-	-	-
3- Hexenol	1095	0,3864	-	-	-
Pentadecanol	1773	3,6226	-	-	2,243
Docosano	2200	1,2555	29,8688	23,1823	19,8165
Tetracosano	2400	2,8186	20,9335	22,8112	16,7612
Pentacosano	2500	15,7198	7,4811	12,6941	8,0123
Óxido de Carofileno	1582	-	-	6,8989	-
$\alpha$ -Selineno	1498	-	-	0,6856	-
Limoneno	1132	-	-	1,6021	-
$\alpha$ -Farneseno	1505	-	-	3,2396	-
Heneicosano	2100	-	-	1,5398	23,1917
Alcool Heptadecil	2290	-	-	2,044	5,0872
Teaspirano B	1550	-	-	-	0,3908

Fonte: Do autor (2019)

O limoneno está relacionado com o cheiro forte de laranja, o qual constitui o aspecto cítrico final do aroma da espécie em estudo. Esse composto possui ação inseticida e pode conferir resistência a insetos em algumas plantas, sendo bastante utilizado em indústrias de sabor e fragrância (Thomas e Bessière, 1989; Sowndhararajan et al., 2015). Já  $\alpha$ -Selineno é um sesquiterpeno que não faz parte da composição do cheiro dos óleos as quais se apresenta, porém está presente na composição química dos óleos essenciais de diversas plantas como a Guamirim (*Calyptanthes concinna*), citronela (*Cymbopogon nardus*), tiririca (*Cyperus rotundus*), entre outras (LIMBERGER et al., 2002; LAWAL & OYEDEJI, 2009; SILVA et al., 2011).

Já o  $\alpha$ -Farneseno é um sesquiterpeno relacionado com a defesa das plantas à afídeos, além de conferir o sabor de alguns vegetais, sendo encontrado naturalmente revestindo frutas como maçã e pera. Em óleos essenciais, esse composto também se relaciona com o cheiro de floral-verde ou amadeirado, sendo um dos constituintes majoritários do óleo de gengibre (HARBONE, 1997; ANDRADE et al., 2012), assim, a presença desse composto no óleo essencial de rosas inoculadas com o *B. pumilus* pode indicar uma ativação do sistema de

defesa da planta que produziu esse metabólito, o que proporcionou não somente ação repelente contra predadores bem como a alteração no odor da rosa.

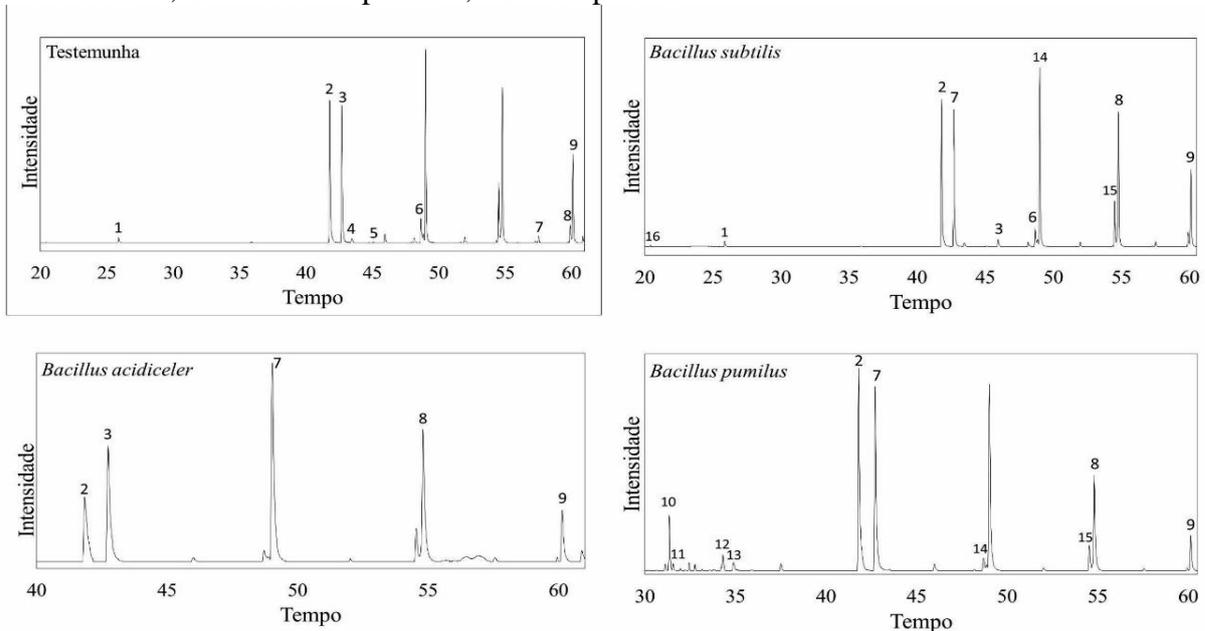
Semelhante ao  $\alpha$ -Farneseno, o óxido de carofileno é também um constituinte majoritário de óleos essenciais de algumas plantas que podem apresentar compostos tóxicos. Esse composto tem o potencial de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, sendo tóxico também para formigas e fungos associados a elas. Além disso, o óxido de carofileno presente em óleos essenciais já foi associado a ação analgésica e anti-inflamatória e pode induzir apoptose em linfoma e células de neuroblastoma (NOROUZI-ARASI et al., 2006; JUDZENTIENEA et al., 2010; SAIN et al., 2014). A presença desse composto pode indicar melhoria nas propriedades medicinais do óleo de rosas, assim como influenciar na defesa das mesmas contra formigas cortadeiras.

Os álcoois e ésteres são os principais constituintes encontrados no óleo essencial de diversas variedades e espécies de rosas, configurando em algumas mais de 80 % dos componentes chave de seus aromas, onde os álcoois são os componentes utilizados na avaliação da qualidade do óleo essencial de rosas (XIAO et al., 2018).

Os compostos myrtanol, álcool cetil, eicosano, ácido hexadecanóico, hexenol, docosano, tetracosano, pentacosano, heneicosano e o álcool heptadecil fazem parte dos compostos voláteis do óleo essencial das espécies de roseiras destinadas à extração de óleos essenciais. Porém, sua presença e quantidade no óleo pode variar dependendo do manejo, condições ambientais, da metodologia e tempo de extração (ÖZEL et al., 2004; JOICHI et al., 2005; XIAO et al., 2018).

Os tempos de retenção dos componentes são apresentados na Figura 1.

**Figura 1.** Cromatografia dos óleos essenciais relacionando o tempo de retenção e a intensidade de cada componente dos óleos de rosas cultivar Príncipe Negro, de acordo com cada bactéria promotora de crescimento, sendo: 1- Myrtanol; 2- Álcool cetil; 3- Eicosano; 4- Ácido hexadecanóico; 5- Hexenol; 6- Pentadecanol; 7- Docosano; 8- Tetracosano; 9- Pentacosano; 10- Carofileno ;11-  $\alpha$ -Selineno; 12- Limoneno; 13-  $\alpha$ -Farseno; 14- Heneicosano;15- Álcool Heptadecil; 16- Teaspirano.



Fonte: Do autor (2019)

A promoção de crescimento de plantas também já foi comprovada em estirpes de *B. pumilus*, mostrando sua eficiência não somente no crescimento, desenvolvimento e produção das plantas, como também auxilia na resistência a alguns estresses ambientais, como o estresse salino e a seca, e a tolerância a metais pesados, auxiliando também na redução de espécies reativas de oxigênio, no aumento do conteúdo de metabólitos secundários e no aumento da atividade de enzimas antioxidantes (KHAN et al., 2016; SIRAJUDDIN, 2016; XIE et al., 2019). O potencial desses microrganismos em estimular a produção e acúmulo de metabólitos secundários pode explicar o aumento do teor de óleo essencial nas rosas e aos diferentes compostos presentes na composição química do óleo extraídos das rosas inoculadas com o *B. pumilus*

#### 4. CONCLUSÃO

A aplicação das bactérias *Bacillus acidicer* e *Bacillus pumilus* aumentaram o tamanho da flor e das hastes florais. *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* apresentaram melhores resultados na produção dos óleos essenciais de rosas. O *Bacillus pumilus* aumentou o peso das

pétalas frescas e o rendimento do óleo essencial, alterando de forma positiva a composição química do óleo essencial extraído de rosas cultivar Príncipe Negro.

## **5. AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores também agradecem ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e ao Laboratório de Análises Químicas de Óleos Essenciais por cederem os equipamentos para as análises.

## 6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy, Carol Stream: Allured, p. 469, 2007.
- ALI, B. Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. Turkish Journal of Botany, v. 39, n.1, p. 1-9, 2015.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012
- ANDREES, H.; HAIDER, M.S.; ANJUM, T.; AKRAM, W. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. crop protection, v. 115, p. 75-83, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In: Farmacopeia Brasileira, Brasília, 5th ed. v. 1, p. 198-199, 2010.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Quimica Nova, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- CASTANHEIRA, N.L., DOURADO, A.C., PAIS, I., SEMEDO, J., SCOTTI-CAMPOS, P., BORGES, N., et al., 2017. Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. Microbiology Research, v. 198, p. 47-55, 2017.
- CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N.; WILLERDING, A.L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, v. 60, 60 p., 1995.
- GAGNÉ-BOURQUE, F.; MAYER, B.F.; CHARRON, J.B.; VALI, H.; BERTRAND, A. Accelerated Growth Rate and Increased Drought Stress Resilience of the Model Grass *Brachypodium distachyon* Colonized by *Bacillus subtilis* B26. PLoS One, v.10, n.6, 23 p., 2015.
- GLICK, B.R. Plant growth-promoting bactéria: mechanisms and applications. Scientifica, v.1, 15 p., 2012.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a guide for bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciencia e Agrotecnologia, v. 38, p. 109–112, 2014.
- HARBONE, B.J. Biochemical plant ecology. Plant Biochemistry, p. 503-516, 1997.

JOICHI, A.; YOMOGIDA, K.; AWANO, K.; UEDA, Y. Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, p. 152–157, 2005.

JUDZENTIENEA, A.; BUDIENEA, J.; BUTKIENEA, R.; KUPCINSKIENEB, E.; LAFFONT-SCHWOBC, I.; MASOTTIC, V. Caryophyllene Oxide-rich Essential Oils of Lithuanian *Artemisia campestris* ssp. *campestris* and Their Toxicity. *Natural Product Communications*, v. 5, n. 12, p. 1981-1984, 2010.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. *Ornamental Horticulture, Campinas*, v. 23, n. 2, p. 178-184, 2017.

KHAN, A.X.Q.; ZHAO, S.; JAVED, M.T.; KHAN, K.S.; BANO, A.; SHEN, R.F.; MASOOD, S. *Bacillus pumilus*, enhances tolerance in rice (*Oryza sativa*, L.) to combined stresses of NaCl and high boron due to limited uptake of Na<sup>+</sup>, *Environmental Experimental Botany*, v. 124, p. 120-129, 2016.

KUMAR, A. Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *International Journal of Advanced Research*, v. 4, p. 116–124, 2016.

LAWAL, O.A.; OYEDEJI, A.O. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa, *Molecules* v. 14, p. 2909-2917, 2009.

LIMBERGER, R.P.; SIMÕES-PIRES, C.A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 3, 2002.

MAJI, D.; BARNAWAL, D.; GUPTA, A.; KING, S.; Singh, A.K.; KALRA, A. A natural plant growth promoter calliterpenone from a plant *Callicarpa macrophylla* Vahl improves the plant growth promoting effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, p. 833–839, 2013.

MONDANI, F.; KHANI, K.; HONARMAND, J.S.; SAEIDI, M. Evaluating effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the radiation use efficiency and yield of soybean (*Glycine max*) under water deficit stress condition. *Agricultural Water Management*, v. 213, p. 707-713, 2019.

MOUBAYIDIN, L., DIMAMBRO, R., SABATINI, S. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Sciences.*, v. 14, n. 10, p. 557-562, 2009.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270, 1999.

NOROUZI-ARASI, H.; YAVARI, I.; CHALABIAN, F.; KIAROSTAMI, V.; GHAFFARZADEH, F.; NASIRIAN, A. Chemical constituents and antimicrobial activities of the essential oil of *Acroptilon repens* (L.) DC. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 21, p. 247-249, 2006.

- ÖZEL, M.Z.; ANTHONY, A.; CLIFFORD, A.A. Superheated water extraction of fragrance compounds from *Rosa canina*, *Flavour Fragr. J.* v. 19, p. 354–359, 2004.
- PATRASCU, M.; RADOIU, M. Rose Essential Oil Extraction from Fresh Petals Using Synergetic Microwave & Ultrasound Energy: Chemical Composition and Antioxidant Activity Assessment *J. Chem. Chem. Eng.*, v. 10, p. 136-142, 2016.
- PIRBALOUTI, A.G.; ORAIE, M.; POURIAMEHR, M.; BABADI, E.S. Effects of drying methods on qualitative and quantitative of the essential oil of Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.). *Industrial Crops & Products*, v. 46, p. 324-327, 2013.
- ROSLON, W.; WAJS-BONIKOWSKA, A.; GESZPRYCH, A.; OSINSKA, E. Characteristics of Essential Oil from Young Shoots of Garden Angelica (*Angelica archangelica* L.). *Journal of essential oil bearing plants*, v. 19, n. 6, p. 1462 – 1470, 2016.
- SAIN, S.; NAOGHARE, P.K.; DEVI, S.S.; DAIWILE, A.; KRISHNAMURTHI, K.; ARRIGO, P.; CHAKRABARTI, T. Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from Aegle Marmelos, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells, Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, v. 13, p. 45-55, 2014.
- SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Comunicado Técnico-Embrapa*, n. 99, p. 1-6, 2004.
- SCHMIDT, T.M.; THOMÉ, A.H.E.; SPEROTTO, R.A.; GRANADA, C.E. Effect of rhizobia inoculation on the development of soil-borne pathogens infecting common bean plants, *European Journal of Plant Pathology*, v. 153, n. 3, p. 687-694, 2019.
- SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; DEL PAPA, M.F.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 371–381, 2009.
- SILVA, C.F.; MOURA, F.C.; MENDES, M.F.; PESSOA, F.L.P. Extraction of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical co<sub>2</sub>: experimental data and mathematical modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 2, p. 343 - 350, 2011.
- SINGH, S.; TRIPATHIA, A.; MAJIA, D.; AWASTHIA, A.; VAJPAYEEB, P.; KALRAA, A. Evaluating the potential of combined inoculation of *Trichoderma harzianum* and *Brevibacterium halotolerans* for increased growth and oil yield in *Mentha arvensis* under greenhouse and field conditions. *Industrial Crops & Products*, v.131, p. 173–181, 2019.
- SIRAJUDDIN, K.A.; ALI, L.; CHAUDHARY, H.J.; MUNIS, M.F.H.; MASOOD, S. *Bacillus pumilus* alleviates boron toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) due to enhanced antioxidant enzymatic activity. *Scientia Horticulturae*, v. 200, p. 178-185, 2016.

SOWNDHARARAJAN, K.; CHO, H.; YU, B.; KIM, S. Effect of olfactory stimulation of isomeric aroma compounds, (+)-limonene and terpinolene on human electroencephalographic activity. *European Journal of Integrative Medicine.*, v. 7, p. 561–566, 2015.

TENGA, Z.; SHAOA, W.; ZHANGA, K.; HUOA, Y.; LIA, M. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. *Journal of Environmental Management*, v. 231, p. 189–197, 2019.

THOMAS, A. F.; BESSIÈRE, Y. Limonene. *Natural Product Reports*, v. 6, n. 3, p. 291-309, 1989.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal Chromatography Amsterdam*, v. 11, p. 463–471, 1963.

WANG, Y.Y.; YANG, X.E.; ZHANG, X.C.; DONG, L.X.; ZHANG, J.; WEI, Y.Y.; FENG, Y.; LU, L.L. Improved plant growth and Zn accumulation in grains of rice (*Oryza sativa* L.) by inoculation of endophytic microbes isolated from a Zn hyperaccumulator, *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v. 62, n. 8, p. 1783-1791, 2014.

WANG, W.; WU, Z.; HE, Y.; HUANG, Y.; LI, X.; YE, B. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 164, p 520–529, 2018.

WANG, Q.; YE, J.; WU, Y.; LUO, S.; CHEN, B.; MA, L.; PAN, F.; FENG, Y.; YANG, X. Promotion of the root development and Zn uptake of *Sedum alfredii* was achieved by an endophytic bacterium Sasm05, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 172, p. 97-104, 2019.

YOUNIS, A.; RIAZ, A.; MUSTAQ, N.; TAHIR, Z.; SIDDIQUE, M.I. Evaluation of the suitability of sewage and recycled water for irrigation of ornamental plants. *Communication in Soil Sciences and Plant Analysis*, v. 46, p. 62-79, 2015.

XIAO, Z.; LUO, J.; NIU, Y.; WU, M. Characterization of key aroma compounds from different rose essential oils using gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography–olfactometry and partial least squares regression. *Natural Product Research*, v. 32, n. 13, 1567-1572, 2018.

XIE, Z.; CHU, Y.; ZHANG, W.; LANG, D.; ZHANG, X. *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Environmental and experimental botany*, v. 158, p. 99-106, 2019.