FERNANDA PEDRA BITTENCOURT DA CRUZ

BACTÉRIAS PODEM PROTEGER E ESTIMULAR O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA MEDICINAL *Calendula officinalis*?

Dissertação de Mestrado

Alta Floresta – MT

2023

	FERNANDA PEDRA BITTENCOURT DA CRUZ	Diss. MESTRADO	PPGBioAgro 2023

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTA FLORESTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS – PPGBioAgro

FERNANDA PEDRA BITTENCOURT DA CRUZ

BACTÉRIAS PODEM PROTEGER E ESTIMULAR O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA MEDICINAL *Calendula officinalis*?

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
Coorientador: Prof. Dr. Marco Antonio Camillo de Carvalho
Coorientador: Prof. Dr. Marcos José Gomes Pessoa

Alta Floresta – MT

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

C955b CRUZ, Fernanda Pedra Bittencourt da.
Bactérias Podem Proteger e Estimular o Desenvolvimento daPlanta Medicinal Calendula Officinalis? / Fernanda Pedra Bittencourt da Cruz – Alta Floresta, 2023.
59 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Câmpus de Alta Floresta, Universidade do Estado de Mato Grosso,2023.
Orientador: Oscar Mitsuo Yamashita
Coorientador: Marco Antônio Camillo de Carvalho; MarcosJosé Gomes Pessoa.

1. Azospirillum Brasilense. 2. Bacillus Subtilis. 3. Promotoresde Crescimento. 4. Pseudomonas Fluorescens. I. Fernanda Pedra Bittencourt da Cruz. II. Bactérias Podem Proteger e Estimular o Desenvolvimento da Planta Medicinal Calendula Officinalis?: .

CDU 576.858:633.15

BACTÉRIAS PODEM PROTEGER E ESTIMULAR O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA MEDICINAL *Calendula officinalis*?

FERNANDA PEDRA BITTENCOURT DA CRUZ

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos

Aprovada em: 31/03/2023

Documento assinado digitalmente
gov.br
OSCAR MITSUO YAMASHITA
Data: 19/04/2023 09:55:26-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
Orientador – UNEMAT/ PPGBioAgro

Documento assinado digitalmente
gov.br
CASSIANO GARCIA ROQUE
Data: 19/04/2023 14:48:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Cassiano Garcia Roque
UFMS/ PPG Agronomia

Documento assinado digitalmente
gov.br
IVONE VIEIRA DA SILVA
Data: 19/04/2023 19:40:44-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva
UNEMAT/ PPGBioAgro

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARCOS JOSE GOMES PESSOA
Data: 20/04/2023 13:19:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Marcos José Gomes Pessoa
UNEMAT / AF – Co-orientador

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARCO ANTONIO CAMILLO DE CARVALHO
Data: 19/04/2023 10:04:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Marco Antonio Camillo de Carvalho
UNEMAT / PPGBioAgro – Co-orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Luís Fernando Bittencourt da Cruz, por sua parceria, companheirismo e incentivo e aos meus amados pais, José Arimateia Bittencourt e Maria da Graça Castro Bittencourt, pela presença na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, porque nos deu o seu filho amado JESUS, como modelo de Amor.

Aos meus pais, José Arimatea Bittencourt e Maria da Graça Castro Bittencourt, porque apesar de terem estudado pouco, sempre nos estimularam a estudar.

Ao meu marido Viriato João da Cruz, pela força e ao meu filho Luís Fernando Bittencourt da Cruz, por me incentivar constantemente.

Ao meu Orientador, Professor Doutor Oscar Mitsuo Yamashita por seu comprometimento, orientação, ensinamentos, ajuda e atenção prestada.

Ao Coorientador Professor Doutor Marcos José Gomes Pessoa por sua colaboração e ajuda.

Ao Coorientador Professor Doutor Marco Antonio Camillo de Carvalho, que me retornava com os ensinamentos necessários ajudando a tronar possível esta conquista.

À Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos – PPGBioAgro, pela oportunidade de construir essa etapa de conhecimento, e aos Professores e Palestrantes convidados desta e de outras instituições que contribuíram com a minha formação profissional, repassando seus conhecimentos.

À Secretaria de Estado de Educação – SEDUC, por me permitir essa atualização e realização profissional.

Aos amigos dos laboratórios LaSeM e de LAAV Anatomia vegetal, pelo auxilio, orientações e amizade nos momentos de realização dos experimentos e análises de sementes e plantas.

Aos técnicos de laboratórios, pelo suporte prestado.

Aos funcionários da instituição, pela compreensão.

Aos membros da banca, pelas contribuições.

Aos meus colegas de turma, muito obrigada a todos que contribuíram para realização desta pesquisa.

“As sementes representam a conexão entre o passado e o futuro. Contém a experiência genética acumulada no passado e o potencial para perpetuar a espécie no futuro.”

Júlio Marcos Filho

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....vii

LISTA DE FIGURAS.....viii

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....xi

RESUMO.....xii

ABSTRACT.....xiii

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 1

2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 4

3. CAPÍTULOS..... 6

3.1. UTLIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRECIMENTO EM SEMENTES, ANALISANDO GERMINABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE PLANTA MEDICINAL..... 6

Resumo..... 7

Abstract..... 8

Introdução..... 9

Material e Métodos.....13

Resultados e Discussão.....21

Conclusões.....33

Referências bibliográficas..... 34

3.2. RESPOSTAS ANATÔMICAS DE *Calendula officinalis L.* MEDIADAS POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO.....37

Resumo.....38

Abstract..... 39

Introdução..... 40

Material e Métodos..... 42

Resultados e Discussão.....44

Conclusões..... 54

Referências bibliográficas.....55

4. CONCLUSÕES GERAIS.....58

APÊNDICE.....59

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Resultado da análise química e física do solo utilizado no experimento em vaso com aplicação de bactérias promotoras de crescimento para a cultivar calêndula. Alta Floresta – MT, 2022.....17
Tabela 2. Quadrados médios das variáveis: índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G), comprimento da parte aérea na primeira avaliação (A1A), comprimento da raiz na primeira avaliação (R1A), massa fresca na primeira avaliação (MF1A), massa seca na primeira avaliação (MS1A), comprimento da parte aérea na segunda avaliação (A2A), comprimento da raiz na segunda avaliação (R2A), massa fresca na segunda avaliação (MF2A), massa seca na segunda avaliação (MS2A) de sementes de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com diferentes promotores de crescimento e doses destes. Alta Floresta - MT, 2022.....21
Tabela 3. Quadrados médios das variáveis: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF), comprimento da raiz (CR), total de clorofila (TC), quantidade de folhas (QF),quantidade de flores (QFL), quantidade de botões (QB), quantidade de flores secas (QFLS), total de flores (TFL), massa fresca da folha (MFF), massa fresca do caule (MFC), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca da flor (MFFL), massa fresca total (MFT), massa seca da folha (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da flor (MSFL), massa seca total (MST) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com diferentes promotores de crescimento e modos de aplicação. Alta Floresta - MT, 2022.....24

CAPITULO 2

Tabela 1. Caracteres anatômicos presentes em com aplicação de bactérias promotoras de crescimento para a cultivar calêndula. Alta Floresta – MT, 2022.....52

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1
Figura 1. Equipamentos e móveis no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM). Alta Floresta – MT, 2022.....13
Figura 2. Materiais e utensílios usados no experimento. Alta Floresta - MT, 2022.....15
Figura 3. Aplicação de bactérias promotoras de crescimento em vaso. Alta Floresta - MT, 2022.....17
Figura 4. Procedimentos realizados no experimento a campo. Alta Floresta - MT, 2022.....19
Figura 5. Equipamentos usados para mensurar as variáveis. Alta Floresta - MT, 2022.....20
Figura 6. Comprimento da parte aérea de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com três diferentes promotores de crescimento, utilizando doses crescentes destes. Alta Floresta - MT, 2022.....22
Figura 7. Plantas inoculas com as bactérias após três dias da aplicação foliar. Alta Floresta – MT, 2022.....23
Figura 8. Efeito de promotores de crescimento em relação ao comprimento da raiz (CR) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022 Alta Floresta - MT, 2022.....26
Figura 9. Efeito significativo para o fator promotores de crescimento em relação à quantidade de flores (QFL) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.....27
Figura 10. Efeito do fator promotores de crescimento referentes a massa fresca de flores (MFFL) de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.....28
Figura 11. Efeito significativo do fator modos de aplicação para a massa fresca de raiz (MFR) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.....29
Figura 12. Efeito significativo do fator modos de aplicação referentes à massa seca de raiz (MSR) decalêndula (*Calendulaofficinalis*) Alta Floresta - MT, 2022.....30
Figura 13. Teor de clorofila (spad) de folhas de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*), submetidas a tratamento com *Bacillus subtilis* (BS), *Azospirillum brasilense* (AZ) e *Pseudomonas fluorescens* (PF), sob diferentes condições de aplicação: TEST (ausência de aplicação de microrganismos promotores), SEM (tratamento das sementes), FOL (aplicação foliar), SEM+FOL (tratamento das sementes e posterior aplicação foliar). Comparação entre modos de aplicação para cada microrganismo promotor e comparação entre microrganismos promotores para cada modo de aplicação. Alta Floresta - MT, 2022.....31

CAPITULO 2

Figura 1. A e B - Equipamentos e móveis no Laboratório de Anatomia vegetal e os recipientes plásticos contendo as amostras de folha, caule e raiz sobre o balcão. Alta Floresta – MT, 2022.....42

Figura 2**.** A - capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio; B – microscópio usado para obtenção das imagens analisadas; C – lâmina sendo observada. Alta Floresta - MT, 2022.....43
Figura 3. Vista frontal da superfície adaxial das folhas de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Células epidérmicas (Ce), estômatos (seta). Escala das barras: 20 µm. Alta Floresta – MT, 2022.....44
Figura 4. Vista frontal da superfície abaxial das folhas de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Células epidérmicas (Ce), estômatos (seta). Escala das barras: 20 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....45
Figura 5. Secções transversais da lâmina foliar de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Parênquima paliçádico (Pp), parênquima lacunoso (Pl) e vacúolos com substâncias ergásticas (seta). Escala das barras: 35 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....47
Figura 6. Secções transversais do aspecto geral da nervura central de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras da nervura central com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras da nervura central com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Plano (Pn), convexa (Cv) e levemente convexa (Lc). Escala das barras: 170 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....48
Figura 7. Secções transversais da nervura central ilustrando o sistema vascular de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Sistema vascular da nervura central com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Sistema vascular da nervura central com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Floema (Fl), xilema (seta). Escala das barras: 170 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....49
Figura 8. Secções transversais dos aspectos gerais do caule de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Aspecto geral do caule com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Aspecto geral do caule com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Medula (Md), córtex (Cx), sistema vascular (seta), caule com formato menos ornamentado (seta azul), caule com formato bem ornamentado (seta amarela). Escala das barras: 170 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....50
Figura 9. Secções transversais dos aspectos gerais da raiz de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Aspecto geral da raiz com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Aspecto geral da raiz com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Sistema vascular (Sv), maior raiz (seta azul),

menor raiz (seta amarela). Escala das barras: 170 µm. Alta Floresta - MT, 2022.....51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA ácido indolacético

B.O.D Demanda Biológica de Oxigênio

dm^3 Decímetros cúbicos

RPCP Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

FAA formaldeído, ácido acético e álcool etílico

HCl Ácido clorídrico

IVG Índice de Velocidade de Germinação

KOH Hidróxido de potássio

LAAV Laboratório de Anatomia vegetal

LabFITO Laboratório de Fitotecnia

LaSeM Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia

ml Mililitro

PPGBioAgro Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos

R.A.S Regras para Análise de Sementes

UNEMAT Universidade do Estado do Mato Grosso

v:v Volume por volume.

RESUMO

Cruz, Fernanda Pedra Bittencourt. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, março de 2023. **Bactérias podem proteger e estimular o desenvolvimento da planta medicinal *Calendulla officinalis*?** Orientador: Oscar Mitsuo Yamashita. Coorientador: Marco Antonio Camillo de Carvalho e Coorientador: Marcos José Gomes Pessoa.

As plantas estão expostas a estresses bióticos e abióticos que limitam seu crescimento, desenvolvimento e reduzem sua produtividade. Para tolerar tais estresses, utilizam mecanismos fisiológicos, moleculares e celulares. As rizobactérias desempenham importante papel na medida em que estimulam o seu crescimento, aumentam seu rendimento e sua resiliência. O presente estudo analisa os efeitos da inoculação de três rizobactérias (*Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense e Pseudomonas fluorescens*) em plantas de calêndula. Dividido em dois capítulos. No primeiro avalia-se a eficiência agronômica de diferentes dosagens e modos de aplicação (via sementes, aplicação foliar e combinação de ambos os modos) da forma líquida de inoculantes à base das rizobactérias referente aos aspectos germinativos das sementes e desenvolvimento das plantas. A pesquisa do primeiro capítulo foi dividida em duas etapas, a primeira realizada no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia, com a análise da germinabilidade das sementes. Enquanto que a segunda etapa foi realizada a campo, visando o estudo do desenvolvimento inicial, vegetativo e reprodutivo das plantas sob efeito dos microrganismos promotores de crescimento. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey (5%) com auxílio do software SISVAR e R. Dentre as bactérias analisadas, destaca-se o *Bacillus subtilis*, cuja inoculação foi a que forneceu maior quantidade de massa fresca da flor, inflorescência e maior comprimento da raiz da calêndula. Enquanto que dentre os modos de tratamento a combinação da inoculação nas sementes e aplicação via foliar foi o que mais forneceu quantidade de massa fresca e seca de raiz. No segundo capítulo analisa-se a anatomia da folha, caule e raiz das plantas de calêndula inoculadas comparando-as com as não inoculadas para averiguar a existência de diferenças anatômicas decorrentes desta inoculação. A realização da anatomia empregou amostras coletadas e levadas ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta. Foram lavadas com água destilada e acondicionadas durante 72 horas em solução fixadora e transferidas para solução de álcool etílico 70% para armazenamento. Os cortes transversais foram realizados manualmente com lâminas descartáveis. Clarificados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e lavados com água destilada e submetidos aos corantes azul de Astra e fucsina básica. Montou-se lâminas histológicas, documentadas em foto microscópio Leica® ICC50. Os resultados obtidos comprovam a capacidade das rizobactérias em alterar a anatomia das plantas de calêndula. As principais respostas anatômicas foram observadas no tamanho das células epidérmicas, estômatos, formato e tamanho das células do parênquima paliçádico e lacunoso, quantidade de camadas de parênquima paliçádico e lacunoso, formato da nervura central, tamanho do sistema vascular, tamanho do caule, formato do caule, tamanho do córtex e da medula, tamanho da raiz e do sistema vascular. Observam-se respostas de crescimento especificas de cada órgão vegetativo em função da ação de cada bactéria.
Palavras-chave: *Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis,* promotores de crescimento, *Pseudomonas fluorescens.*

ABSTRACT

Cruz, Fernanda Pedra Bittencourt. M.Sc. State University of Mato Grosso, March 2023. **Can bacteria protect and stimulate the development of the medicinal plant *Caledula officinalis*?** Advisor: Oscar Mitsuo Yamashita. Co-advisor: Marco Antonio Camillo de Carvalho. Co-advisor: Marcos José Gomes Pessoa.

Plants are exposed to biotic and abiotic stresses that limit their growth, development and reduce their productivity. To tolerate such stresses, they use physiological, molecular, and cellular mechanisms. Rhizobacteria play an important role in stimulating growth and increasing their yield and resilience. The present study analyzes the effects of inoculation of three rhizobacteria (*Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense*, and *Pseudomonas fluorescens*) in marigold plants. In the first chapter, the agronomic efficiency of different dosages and modes of application (via seeds, foliar application, and combination of both ways) of the liquid form of inoculants based on rhizobacteria evaluated, referring to the germination aspects of seeds and plant development. The research in the first chapter was divided in two stages, the first was carried out at the Seed Technology and Matology Laboratory, with the seed germinability analysis. While the second stage was carried out in the field, aiming to study the initial, vegetative, and reproductive development of plants under the effect of growth-promoting microorganisms. The data obtained were subjected to analysis of variance and the means of the treatments compared by the Tukey test (5%) with the aid of the SISVAR and R software. Among the bacteria analyzed, Bacillus subtilis stands out, whose inoculation was the one that provided the highest amount of fresh mass of the flower, inflorescence, and greater length of the calendula root. While among the treatment modes, the combination of seed inoculation and foliar application provided the highest fresh and dry root mass. The second chapter analyzes the anatomy of the leaf, stem, and root of inoculated calendula plants, comparing them with the non-inoculated ones to verify anatomical differences resulting from this inoculation. The anatomy was carried out using samples collected and taken to the Laboratory of Plant Anatomy at the State University of Mato Grosso, Alta Floresta Campus. They were washed with distilled water, conditioned for 72 hours in a fixative solution, and transferred to a 70% ethyl alcohol solution for storage. Cross-sections were performed manually with disposable blades. Clarified with 2% sodium hypochlorite solution, washed with distilled water, and stained with Astra blue and basic fuchsin. Histological slides were mounted and documented in a Leica® ICC50 photo microscope. The results confirm the ability of rhizobacteria to alter the anatomy of marigold plants. The main anatomical responses observed was in the size of epidermal cells, stomata, shape and size of cells in the palisade and spongy parenchyma, number of palisade layers and spongy parenchyma, the midrib ‘shape, the size of the vascular system, the shape and size of the stem, size of cortex and medulla, and the size of root and vascular system. Specific growth responses of each vegetative organ are a function of the action of each bacterium.

Key-words:*Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis,* growth promoters, *Pseudomonas fluorescens*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Tradicionalmente, as plantas medicinais têm sido usadas desde os tempos pré-históricos como alternativa de terapia natural. Conforme avançam as pesquisas e estudos das funções de seus metabólitos secundários, essas plantas tornam-se parte integral da indústria farmacêutica, dos sistemas de saúde e da indústria alimentícia (RIZVI *et al*., 2022). Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 40% de todas as formulações farmacêuticas se baseiam em produtos naturais, incluindo medicamentos como a aspirina e a artemisinina. Por isso a OMS acredita que a contribuição desse tipo de medicina para os sistemas de saúde ao redor do planeta ainda não foi devidamente reconhecida (WHO GLOBAL CENTRE FOR TRADITIONAL MEDICINE, 2023).

Dentre as plantas medicinais empregadas por sua capacidade fitoterápica encontra-se a calêndula (*Calendula officinalis* L.). Originária dos países do Mediterrâneo e conhecida popularmente no Brasil como calêndula, margarida-dourada, mal-me-quer e maravilha, essa planta possui folhas alternas e sem estípulas, podendo atingir até 60 centímetros de altura. Suas flores, de cor amarelo-alaranjado, se abrem ao nascer do sol e se fecham ao final da tarde. Seus frutos são simples, secos, curvos e irregulares com espinhos na face externa (ANVISA, 2014).

O nome vem do latim *kalendae*, se referindo ao primeiro dia do mês do calendário romano, uma provável analogia à sua floração que acreditava-se ocorrer todos os meses (MACHT, 1955; COUPLAN, 2012). Quanto ao seu habitat, prefere solos ricos em matéria orgânica, bem drenados, mas com teor de umidade adequado (SILVA JÚNIOR, 2006). É considerada uma das flores mais versáteis para se cultivar devido ao fato de tolerar a maioria dos solos (ASHWLAYAN et al., 2018).

Cultivada por egípcios, gregos, hindus e árabes, a calêndula tem sido utilizada por suas propriedades fitoterápicas desde o século XII (VAZ; JORGE, 2006). Na medicina popular suas flores secas eram utilizadas por suas propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antifebril, antiedematosa e cicatrizante (TEITEN et al., 2013). Diversos estudos corroboram sua aplicação fitoterápica, destacando suas propriedades antibacteriana (HAMAD; MOHAMMED; MERDAW, 2017), redutora de placas dentárias e gengivite (KHAIRNAR, 2013), eficiente contra úlceras venosas (DURAN, 2005), além de ter mostrado resultados promissores no tratamento contra o câncer (HERNÁNDEZ-ROSAS *et al.*,

2018). Estudos comprovam o potencial do extrato das inflorescências de C. *officinalis* na cicatrização de úlceras gástricas crônica, diminuindo a área lesionada, aumentando os fatores protetores da mucosa gástrica, como muco e fatores antioxidantes, além de aumentar a síntese de colágeno (SILVA *et al.*, 2020).

Além desses usos, as flores da calêndula também são usadas como parte da alimentação humana, fazendo parte da culinária asiática, europeia e do Oriente Médio. É importante destacar a existência de um mercado em expansão de flores comestíveis em todo o mundo devido ao seu grande consumo na gastronomia, disponibilizando maior variedade e promovendo um crescimento econômico nacional e internacional (GUINÉ *et al*., 2020).

As flores comestíveis podem ser consumidas com segurança, pois, desde a antiguidade têm sido usadas na culinária de diversos países, atualmente as flores da calêndula tornaram-se ingredientes muito apreciados por consumidores que buscam alimentos com propriedades benéficas à saúde e qualidade nutricional. O seu uso melhora a aparência, sabor e acrescenta valor estético aos pratos, características que são muito apreciadas e valorizadas pelo consumidor (VINHA, 2021). Ao analisar a caracterização química e as propriedades antioxidantes da calêndula (*Calendula officinalis* L.), da camélia (*Camellia japonica* L.) e da rosa (*Rosa canina* L.) essa autora observou que a *C. officinalis* foi a que apresentou o maior teor em fenólicos totais e carotenoides e maior atividade antioxidante em suas pétalas. Por isso a autora afirma que os efeitos biológicos dos compostos bioativos têm o potencial de promover a saúde, se as pétalas forem incorporadas na alimentação.

As plantas estão constantemente expostas a estresses bióticos e abióticos que limitam seu crescimento, desenvolvimento e que reduzem sua produtividade. Para tolerar tais estresses, elas utilizam diversos mecanismos fisiológicos, moleculares e celulares. Todavia, nem sempre tais mecanismos são suficientes para superar o estresse a que estão submetidas. Por isso, as rizobactérias podem desempenhar um importante papel na medida em que não somente estimulam o crescimento das mesmas, mas também aumentam seu rendimento e sua imunidade contribuindo para aumentar sua resiliência (KUMAR *et al*., 2022).

O uso de bactérias em diversas cultivares tem contribuído para o aumento da produtividade vegetal, destacando-se por seu custo benefício e por sua eficiência no controle de fitopatógenos. Uma vez que a colonização bacteriana das raízes das

plantas é importante para interação entre micróbios e plantas. Assim, o processo de colonização das raízes bem-sucedidos depende das próprias características da bactéria e de sua interação com a planta (BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2020).

A hipótese deste estudo é que as plantas de calêndula inoculadas com as bactérias *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* apresentam crescimento e alterações anatômicas diferentes daquelas observadas nas plantas não inoculadas.

O presente estudo se propõe a avaliar a eficiência agronômica de três rizobactérias através de diferentes dosagens e modos de aplicação (via sementes, aplicação foliar e combinação de ambos os modos) da forma líquida de inoculantes à base de *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* em plantas de calêndula (*Calendula officinalis)* no que diz respeito aos aspectos germinativos das sementes, de desenvolvimento das plantas, bem como, por possíveis alterações anatômicas causadas por esses microrganismos.

Este estudo está organizado em dois capítulos, sendo que o capítulo 1 enfatiza a utilização de bactérias promotoras de crescimento abordando sua inoculação em sementes, dando destaque aos aspectos de germinabilidade e desenvolvimento da planta medicinal analisada. Enquanto que o capítulo 2 discorre sobre as respostas anatômicas da *calendula officinalis* mediadas pelas bactérias promotoras de crescimento apresentadas no capítulo anterior.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Ministério da Saúde e (org.). **Monografia da espécie *Calendula officinalis* (calêndula) L.** 2014. Disponível em: https://www.xn--farmacutico-sbb.com/_files/ugd/ad17d6_d5f8725de54243d2a6ecdc7b9b8e3cf7.pdf?index=true. Acesso em: 18 maio 2022.

ASHWLAYAN, V.D.; KUMAR, A.; VERMA, M.; GARG, V.K.; GUPTA, S.K. Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. **Pharmacy & Pharmacology International Journal, 6:**149-155, 2018.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M.N.; KOVÁCS, A.T. Molecular aspects of plant growth promotionand protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 34:15-25, 2020.

COUPLAN, F. **Les plantes et leurs noms: Histoires insolites.** 1.ed. Versailles: Éditions Quae, 2012. v.1, 224p.

DURAN, V. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. **International Journal Of Tissue Reaction**, 27:101-106, 2005.

GUINÉ, R.P.F.; FLORENÇA, S.G.; MOYA, K.V.; ANJOS, O. Edible Flowers, Old Tradition or New Gastronomic Trend: a first look at consumption in Portugal versus Costa Rica. **Foods**, 9:1-15, 2020.

HAMAD, M.N.; MOHAMMED, H.J.; MERDAW, M.A. Antibacterial activity of *Calendula officinalis* flowers in vitro. **Ibn AL- Haitham Journal for Pure and Applied Science**, 24:1-7, 2017.

HERNÁNDEZ-ROSAS, N.A.; GARCÍA-ZEBADOA, J.C.; HERNÁNDEZ-DELGADO, N.; TORRES-CASTILLO, S.; FIGUEROA-ARREDONDO, P.; MORA-ESCOBEDO, R. Polyphenols profile, antioxidant capacity, and in vitro cytotoxic effect on human cancer cell lines of a hydro-alcoholic extract from *Calendula officinalis* L. petals. **Tip. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, n. 1, p. 54-64, 2018.

KHAIRNAR, M.S. Evaluation of *Calendula officinalis* as an anti-plaque and anti-gingivitis agent. **Journal Of Indian Society of Periodontology**,17:741-747, 2013.

KUMAR, R.; SWAPNIL, P.; MEENA, M.; SELPAIR, S.; YADAV, B.G. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Approaches to alleviate abiotic stresses for enhancement of growth and development of medicinal plants. **Sustainability**, 14:1-16, 2022.

MACHT, D.I. CALENDULA OR MARIGOLD IN MEDICAL HISTORY AND IN SHAKESPEARE. **Bulletin of The History of Medicine**, 29:491-502, 1955.

RIZVI, A.; AHMED, B.; KHAN, M. S.; EL-BELTAGI, H. S.; UMAR, S.; LEE, J. Bioprospecting plant growth promoting rhizobacteria for enhancing the biological

properties and phytochemical composition of medicinally important crops. **Molecules**, 27:1-31, 2022.

SILVA, L.M.; ARAÚJO, A.C.; BUNN, V.S.; MARIANO, L.N.B.; SOMENSI, L.B.; KLEIN JUNIOR, L.C.; ANDRADE, S.F. *Calendula officinalis* L. inflorescences extract: in vivo evaluation of its gastric ulcer healing potential. **Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica**,17:1-15, 2020.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Essentia herba**: plantas bioativas. 1 ed. Florianópolis: Epagri, 2006. v. 1, 599 p.

TEITEN, M.H.; GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. **Biochemical Pharmacology**, 86:1239-1247, 2013.

VAZ, A.P.A.; JORGE, M.H.A. **Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**: calêndula. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006.

VINHA, A.F. FLORES EDÍVEIS: uma alternativa alimentar com propriedades biológicas reconhecidas. In: CASTRO, L.H.A. (org.). **Dinamismo e clareza no planejamento em ciências da saúde 4**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena, 2021. p.149-168.

WHO GLOBAL CENTRE FOR TRADITIONAL MEDICINE. **Catalysing ancient wisdom and modern science for the health of people and the planet**. Disponível em: https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine. Acesso em: 07 mar. 2023.

3. CAPÍTULOS

3.1. UTLIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRECIMENTO EM SEMENTES, ANALISANDO GERMINABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE PLANTA MEDICINAL

Resumo – (Utilização de bactérias promotoras de crescimento em sementes, analisando germinabilidade e desenvolvimento de planta medicinal). A utilização de bactérias em diversas cultivares tem se tornado uma alternativa interessante devido ao seu custo benefício, por sua eficiência no controle de fitopatógenos e por sua contribuição para o aumento da produtividade vegetal. Assim, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas é considerada uma importante estratégia para redução do uso de fertilizantes. Por isso, o presente capítulo avalia a eficiência agronômica de diferentes dosagens e modos de aplicação (via sementes, aplicação foliar e combinação de ambos os modos) da forma líquida de inoculantes à base das bactérias *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense e Pseudomonas fluorescens* em plantas de calêndula (*Calendula officinalis*) no que diz respeito aos aspectos germinativos das sementes e de desenvolvimento das plantas. Para isso, a pesquisa foi dividida em duas etapas, sendo a primeira realizada no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) da Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta - MT, com a análise da germinabilidade das sementes. Enquanto que a segunda etapa foi realizada a campo, com a coleta e posterior avaliação das plantas de calêndula visando o estudo do desenvolvimento inicial, vegetativo e reprodutivo das plantas sob efeito dos microrganismos promotores de crescimento sendo realizado no LaSeM. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey (5%) com auxílio do software SISVAR e R. Os resultados obtidos permitem afirmar que dentre as bactérias analisadas, *Bacillus subtilis* se destaca, pois, a sua inoculação foi a que forneceu maior quantidade de massa fresca da flor, maior quantidade de flor e maior comprimento da raiz da calêndula. Enquanto que dentre os modos de tratamento a combinação da inoculação nas sementes e aplicação via foliar foi o que mais forneceu quantidade de massa fresca e seca de raiz. Os resultados obtidos corroboram o uso das bactérias analisadas como agentes biológicos de promoção de crescimento das plantas de calêndula.

Palavras chave: Eficiência agronômica; *calendula officinalis*; promotores de crescimento.

Abstract – (Use of growth-promoting bacteria in seeds, analyzing germinability and development of medicinal plants). Bacterial inoculation in different plants has become a compelling alternative due to its cost-effectiveness, efficiency in controlling phytopathogens, and contribution to increasing plant productivity. The application of plant growth-promoting bacteria is considered one of the main strategies for reducing the use of chemical fertilizers. Therefore, the present chapter evaluates the agronomic efficiency of different dosages and inoculation modes (on seeds, foliar, and a combination of both) of *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense*, and *Pseudomonas fluorescens* bacteria-based liquid inoculants in marigold plants (*Calendula officinalis*) concerning germination aspects of seeds and plant development. To this end, the procedures were conducted in two stages, the first carried out in the Seed Technology and Matology Laboratory (LaSeM) at the Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Alta Floresta – MT campus, where the seed germinability analysis was performed. While the second stage was fieldwork, with the collection and subsequent assessment of samples aimed at studying the initial, vegetative, and reproductive development of plants under the effect of growth-promoting microorganisms performed at LaSeM. The data obtained were submitted for analysis of variance and the measurements of the treatments compared by Tukey's test (5%) using SISVAR and R software. Among the bacteria analyzed, Bacillus subtilis stands out, as the inoculation with this bacterium was the one that provided the highest amount of fresh mass of the flower, greater amount of flower, and greater length of the marigold root. While among the treatment modes, the combination of seed inoculation and foliar application provided the highest amount of fresh and dry root mass. The obtained results corroborate employing the analyzed bacteria as growth-promoting biological agents of marigold plants.

Key-words: Agronomic efficiency; *calendula officinalis*; growth promoters.

Introdução

Criado na década de 1980 por Joe Kloepper, o termo RPCP refere-se à rizobactérias que colonizam a raiz das plantas promovendo o seu crescimento ou até mesmo reduzindo os danos causados por insetos ou patógenos (DAVID; CHANDRASEHAR; SELVAM, 2018).

Dentre as rizobactérias destaca-se *Bacillus subtilis* que é comum no solo e desempenha um importante papel ao conferir às plantas tolerância aos stress biótico e abiótico seja por induzir a resistência sistêmica das mesmas, pela formação do biofilme ou através da produção de lipopeptídeo. Como ferramenta de biorremediação tem a capacidade de purificar solos contaminados com metais, agindo como um potente agente de desnitrificação, aprimorando o processo de sequestro de carbono quando aplicado em concentrações reguladas. Essa rizobactéria abriga diversos genes de resistência à antibióticos e pode reduzir a transferência horizontal desses genes durante o processo de compostagem de esterco modificando a composição genética da microbiota existente (MAHAPATRA; YADAV; RAMAKRISHNA, 2022).

A rizobactéria *B. subtilis* pode ser isolada desde o solo até os habitats marinhos, sendo a espécie mais estudada do gênero por sua capacidade natural de captação do DNA extracelular, facilitando as modificações genéticas simples e a própria ocorrência de esporulação. Os esporos dormentes podem sobreviver à alta temperatura, dessecação, radiação eletromagnética UV e radiação gama (γ), predação por microorganismos e macroorganismos e até condições extraterrestres. É utilizada em diversas aplicações como a produção de enzimas e fermentação de alimentos até no biocontrole de patógenos de plantas. É um microrganismo modelo para o estudo da divisão celular, da secreção de proteínas, da motilidade superficial (seja por natação, enxame e deslizamento), do desenvolvimento de biofilme, da fixação à raiz da planta ou hifas fúngicas, da produção de metabólitos secundários, da troca de citoplasma via nanotubos intercelulares, da liberação de vesícula extracelular e da discriminação de parentes (kin-discrimination) (KOVÁCS, 2019; BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2020).

É importante apontar que a aplicação agrícola dessa rizobactéria costuma falhar pelo fato de a mesma não conseguir persistir na rizosfera. Uma vez que a colonização bacteriana das raízes das plantas não somente é crucial na interação entre micróbios e plantas, mas também é de grande importância para o seu efeito de

promoção do crescimento vegetal e sua capacidade de biocontrole. Assim, o processo de colonização das raízes bem-sucedidos depende tanto das próprias características da bactéria, da motilidade, da formação de biofilmes e de sua interação com a planta (KOVÁCS, 2019; BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2020).

Por isso Kang *et al*. (2019) afirmam que o *B. subtilis* pode ser utilizado como biofertilizante promotor do crescimento vegetal. Esses autores chegaram a essa conclusão após inocularem cepas dessa bactéria em plantas de repolho e observarem um significativo aumento na altura, biomassa, teor de clorofila e de absorção de nutrientes nas plantas inoculadas com relação ao grupo testemunha após sucessivos testes em campos agrícolas.

Outro gênero de rizobactéria muito conhecido é o *Azospirillum* cujos benefícios fornecidos às plantas inoculadas têm sido atribuídos a não somente à sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, mas também à sua capacidade de sintetizar fitohormônios, especialmente o ácido indolacético. Outro destaque fica por conta de a capacidade dessas bactérias conferirem às plantas tolerância a estresse biótico e abiótico, que pode ser mediado através da ação dos fitohormônios que atuam como moléculas sinalizadoras (BATABYAL, 2021).

A tolerância a estresses bióticos ocorre por mecanismos de resistência sistêmica induzida, mediada pelo aumento dos níveis de fitohormônios na via de ácido jasmônico e etileno, independente do ácido salicílico (AS), enquanto na resistência sistêmica adquirida ela é controlada por níveis intermediários de AS. Os mecanismos desencadeados por bactérias do gênero *Azospirillum* nas plantas podem ajudar na busca por uma agricultura mais sustentável, fornecendo novas práticas e até mesmo viabilizando o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal como uma importante estratégia para mitigar os efeitos dos estresses abióticos na produtividade agrícola (TARRAND *et al.*, 1978; SANTOS *et al*., 2021).

O desenvolvimento de cultivares mais eficientes em termos de aproveitamento do nitrogênio juntamente com a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas é considerado uma das principais estratégias para redução do uso de fertilizantes. Embora as cepas de *Azospirillum* usadas em formulações comerciais de inoculantes apresentem atividade diazotrófica, sua capacidade de produzir fitohormônios desempenha um papel fundamental na promoção do crescimento das plantas, levando a uma recomendação geral de seu uso em associação com doses

regulares de fertilizantes nitrogenados (TARRAND *et al.*, 1978; BATABYAL, 2021; SANTOS *et al*., 2021).

É importante destacar a existência de uma alta variabilidade na eficácia dos inoculantes que empregam bactérias do gênero *Azospirillum* em condições de campo, o que corrobora a adoção da tecnologia de inoculação como uma prática de manejo adicional ao invés de seu uso como uma prática alternativa ao uso de insumos químicos na agricultura (TARRAND *et al.*, 1978; BATABYAL, 2021; SANTOS *et al*., 2021).

Toffoli *et al*. (2021) corroboram a capacidade de promoção de crescimento vegetal da *A. brasilense* em plantas de petúnias ao averiguar que o comprimento da raiz, peso seco da raiz e de folhas, área foliar, verdor das folhas, teor de nutrientes, primeira floração e número de flores por plantas foi superior naquelas que foram inoculadas com diferentes variantes desta bactéria do que nas plantas do grupo testemunha.

A *Pseudomonas fluorescens*, por sua vez, é um microrganismo saprófito fluorescente que se locomove por meio de múltiplos flagelos polares. Seus requisitos nutricionais são simples e ela cresce bem em meios de sais minerais suplementados com qualquer uma das muitas fontes de carbono. Muito comum na rizosfera ao redor de várias espécies de plantas, esse microrganismo tem a capacidade de melhorar o vigor das plantas ao incorporar nutrientes livres e hormônio de crescimento vegetal. Destaca-se ainda por desempenhar um importante papel no processo de purificação de poluentes através da biorremediação em grandes indústrias químicas e de material em decomposição através de seus metabólitos secundários, bem como desempenha o papel de biocontrole de alguns patógenos prejudiciais à lavoura (NEPALI; BHATTARAI; SHRESTHA, 2018).

A planta medicinal analisada neste estudo é a *Calendula officinalis L*. Usada por muitas civilizações por sua capacidade fitoterápica e originária dos países do Mediterrâneo, ela tem por habitat solos ricos em matéria orgânica, bem drenados, com teor de umidade adequado (SILVA JÚNIOR, 2006). É considerada uma das flores mais versáteis de se cultivar devido ao fato de tolerar a maioria dos solos (ASHWLAYAN et al., 2018). Cultivada por egípcios, gregos, hindus e árabes, a calêndula tem sido utilizada por suas propriedades fitoterápicas desde o século XII (VAZ; JORGE, 2006). Suas flores secas eram utilizadas na medicina popular por suas

propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana, antiedematosa e cicatrizante (TEITEN et al., 2013).

A produção comercial de bioprodutos com a utilização de microrganismos em diversas cultivares tem se tornado uma alternativa interessante devido ao seu custo benefício, por sua eficiência no controle de fitopatógenos e por sua contribuição para o aumento da produtividade vegetal, pois o uso intensivo de fertilizantes comerciais e pesticidas tem se tornando oneroso, além de poluir os solos e as águas subterrâneas com a aplicação excessiva desses adubos, o assoreamento de rios, aumento da erosão e degradação dos solos, a perda de fertilidade de solos por falta de matéria orgânica, e a poluição ambiental tornou-se predominante em toda parte pelo acúmulo de lixo e resíduos dos defensivos agrícolas e de outros materiais tóxicos (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019).

A aplicação de baterias contribui para o crescimento vegetal melhorando os mecanismos de promoção de crescimento vegetal e seus efeitos na germinabilidade e no desenvolvimento. Nesse contexto, o presente capítulo se propõe a avaliar a eficiência agronômica de diferentes dosagens e modos de aplicação (via sementes, aplicação foliar e combinação de ambos os modos) da forma líquida de inoculantes à base de *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* em plantas de calêndula (*Calendula officinalis)* no que diz respeito aos aspectos germinativos das sementes e de desenvolvimento das plantas.

Material e métodos

Área de estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAAV) da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, Campus de Alta Floresta - MT, (Figura 1) localizado entre as coordenadas geográficas de 55º 30' a 57º 00' de longitude oeste e 9º 00' e 11º de latitude sul, na altitude de 334 m. O clima de Alta Floresta de acordo com a classificação de (KÖPPEN & GEIGER, 2021) é tropical (Am) com maior pluviosidade no verão que no inverno, com temperatura média de 25,8ºC e a pluviosidade média anual de 1.950 mm.

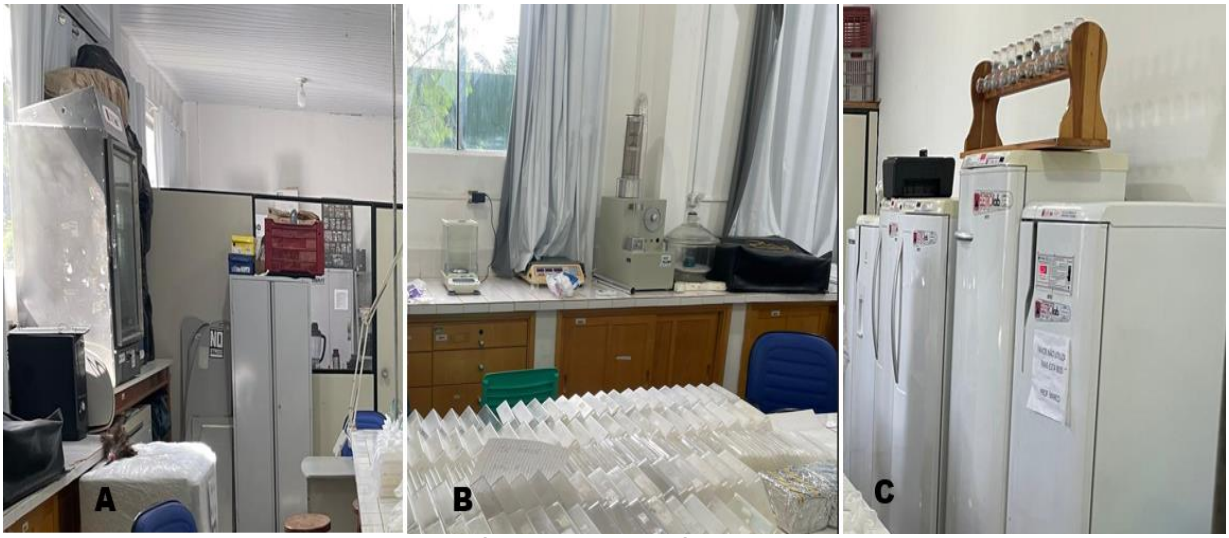

Figura 1**.** A, B e C - Equipamentos e móveis no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM). Alta Floresta - MT, 2022.

Delineamento da Pesquisa

A pesquisa foi dividida em duas etapas, sendo a primeira, realizada no mês de abril de 2022 no LaSeM, com a análise da germinabilidade de sementes da espécie medicinal analisada sob efeito do tratamento com *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*.

A segunda etapa foi realizada no mês de agosto de 2022 a campo, porém as avaliações das variáveis: altura da planta, diâmetro do caule, área foliar, comprimento da raiz, total de clorofila, quantidade de folhas, quantidade de flores, quantidade de botões, quantidade de flores secas, total de flores, massa fresca da folha, massa fresca do caule, massa fresca da raiz, massa fresca da flor, massa fresca total, massa

seca da folha, massa seca do caule, massa seca da raiz, massa seca da flor , massa seca total de plantas da *Calendula officinalis* foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) e no Laboratório de Anatomia vegetal, visando o estudo do desenvolvimento inicial, vegetativo e reprodutivo das plantas sob efeito dos microrganismos promotores de crescimento. Os tratamentos adotados na segunda etapa foram quatro diferentes modos de aplicação: TEST (ausência de aplicação de microrganismos promotores), SEM (tratamento das sementes), FOL (aplicação foliar), SEM+FOL (tratamento das sementes e posterior aplicação foliar), com os três microrganismos (*Bacillus subtilis* (BS), *Azospirillum brasilense* (AZ) e *Pseudomonas fluorescens* (PF).

Análise da germinação de sementes e emergência de plântulas

As sementes de calêndula foram adquiridas de empresa produtora de sementes de espécies medicinais. Na primeira etapa da pesquisa para testar a germinação de sementes de calêndula, a execução do experimento foi realizada no mês de abril de 2022. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, onde os tratamentos consistiram na combinação de três tipos de microrganismos promotores de crescimento (*Bacillus subtilis* (BS); *Azospirillum brasilense* (AZ); *Pseudomonas fluorescens* (PF) e quatro doses de cada inoculante (BS – 0, 200, 400 e 600 mL50kg^{-1} de sementes; AZ - 0, 50, 100 e 150 mL25kg^{-1} de sementes; PF - 0, 70, 140 e 210 mL50kg^{-1} de sementes), com quatro repetições cada, totalizando doze tratamentos e 48 unidades experimentais.

Os produtos comerciais contendo as bactérias foram colocados em recipientes usando uma pipeta volumétrica, misturando para homogeneização completa e aplicando diretamente nas sementes, exceto nas sementes do tratamento controle. Em cada unidade experimental, representada por uma caixa transparente (gerbox 11,0x11,0x3,5 cm), foram colocadas 25 sementes de calêndula com os diferentes tratamentos sobre duas folhas de papel germibox, umedecidas com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes a massa do substrato seco (BRASIL, 2009). (Figura 2). As caixas gerbox transparente, água, pince, papel germibox e os demais utensílios usados durante o experimento foram higienizados e/ou autoclavados anteriormente.

Após a instalação do experimento, as caixas foram colocadas em saco plástico transparente identificados os quais foram colocados aleatoriamente na câmara de germinação tipo BOD com temperatura constante de 25ºC. Diariamente e sempre no mesmo horário era observado o número de sementes germinadas, até estabilização da germinação por cinco dias consecutivos. Na primeira avaliação, após um período de 7 dias foi realizada a leitura das sementes germinadas e em seguida as caixas foram colocadas novamente na BOD mudando-as de local de modo que todas ocuparam todos os espaços desse ambiente.

As sementes foram consideradas germinadas quando a raiz primária apresentou comprimento igual ou superior a 2,0 mm.

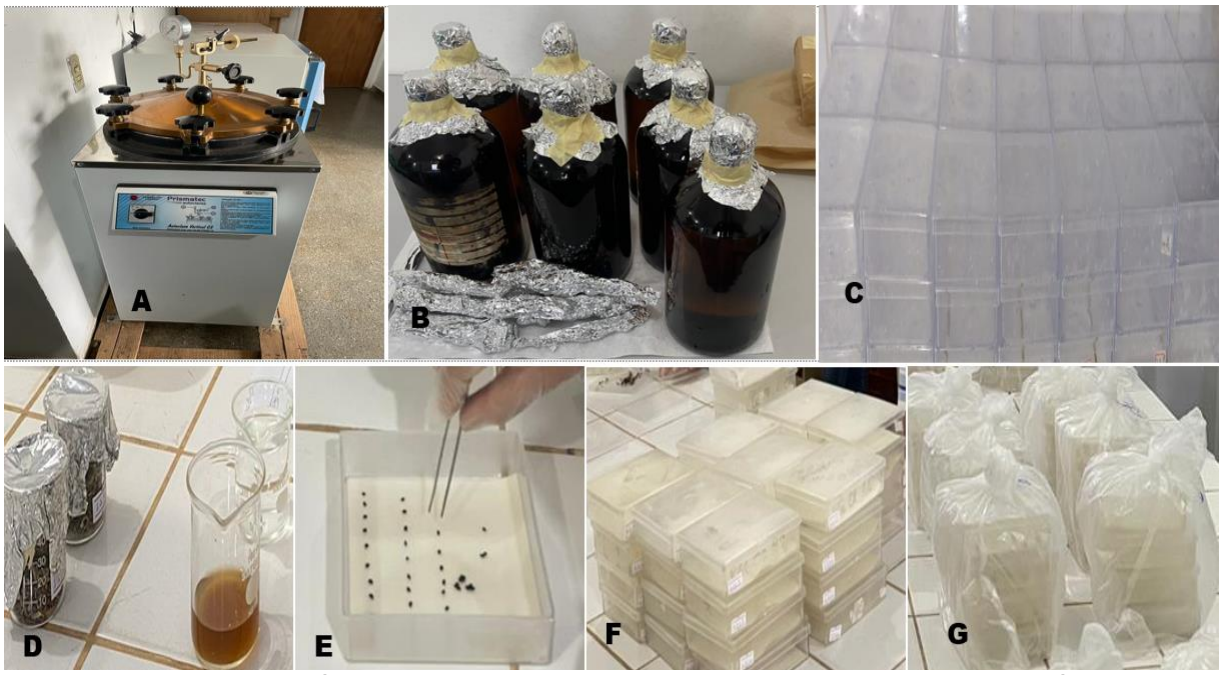

Figura 2**.** Materiais e utensílios usados no experimento: A - autoclave; B - recipiente com água e outros materiais autoclavados; C - caixas gerbox transparente higienizadas; D - sementes inoculadas para o experimento; E – sementes sendo distribuídas na caixa gerbox; F - experimentos identificados; G - tratamentos embalados em saco plástico transparente e identificados. Alta Floresta - MT, 2022.

Após o final da avaliação da germinação, mediu-se o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz de cinco plântulas escolhidas aleatoriamente de cada caixa gerbox, em seguida foi aferido o peso da massa fresca das mesmas e em seguida colocadas em saco de papel Kraft devidamente identificados e mantidos dentro de estufa de circulação forçada de ar a 50 °C por 72 horas para determinação de massa seca das plântulas determinada em balança de precisão (0,001 g). A segunda avaliação da calêndula foi feita após catorze dias, realizando os mesmos procedimentos da primeira avaliação.

As variáveis analisadas na primeira avaliação foram: índice de velocidade de germinação, porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, massa fresca, massa seca. Na segunda avaliação foram analisadas as variáveis comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, massa fresca e massa seca de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*).

A taxa de germinação foi calculada através da equação proposta por SAUPE (2009):

$$\text{Germinação} = \frac{Número\ de\ sementes\ germinadas}{Total\ de\ sementes} \text{ x } 100$$

A velocidade de germinação foi calculada através do Índice de Velocidade de Germinação proposto por MAGUIRE (1962):

$$\text{IVG} = \frac{N_1}{D_1} + \frac{N_2}{D_2} + \ldots + \frac{N_n}{D_n}$$

Onde N representa o número de plântulas verificadas no dia da contagem e D é o número de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e quando significativos os dados qualitativos (Promotor) foram submetidos ao teste de Tukey (5%) e os qualitativos (doses) ao estudo de regressão polinomial com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2014).

Análise do desenvolvimento inicial, vegetativo e reprodutivo

Em agosto de 2022 foram separados e aplicados os microrganismos promotores de crescimento em sementes para cultivo a campo da calêndula, distribuindo 25 sementes por vaso (Figura 3), sendo as análises realizadas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) e no Laboratório de Anatomia vegetal. Os tratamentos adotados na segunda etapa surgiram da combinação de quatro diferentes modos/condições de aplicação: TEST (ausência de aplicação de microrganismos promotores), SEM (tratamento das sementes), FOL (aplicação foliar), SEM+FOL (tratamento das sementes e posterior aplicação foliar), combinados com os três microrganismos promotores de crescimento: *Bacillus subtilis* (BS) UFMT 001: $1X10^9$ ufc/mL; *Azospirillum brasilense* (AB) Estirpes Ab-V5 e Ab-V6; *Pseudomonas fluorescens* (PF) GC 00 1: $1,5X10^8$. Para avaliar o efeito da inoculação desses microrganismos empregam-se testes com base na metodologia descrita por Dennis & Wester (1971) com modificações.



Figura 3. Aplicação de bactérias promotoras de crescimento em vaso. A – aplicação de solução com os microrganismos promotores de crescimento em sementes; B - sementes inoculadas para semeadura em vaso; C – distribuição de sementes em vaso; D - vasos com os experimentos identificados. Alta Floresta - MT, 2022.

O solo utilizado para o preenchimento dos vasos foi obtido em zona rural da região de Alta Floresta – MT, área cujo substrato não tem histórico de contaminante, com equilíbrio mínimo de nutrientes sendo garantido após a devida análise no Laboratório de Análises de Solo, Adubo e Foliar- LASAF, onde foi realizada a determinação química e física do mesmo (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da análise química e física do solo utilizado no experimento em vaso com aplicação de bactérias promotoras de crescimento para a cultivar calêndula. Alta Floresta – MT, 2022.

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	V	Areia	Silte	Argila
H_2O	mg.dm^{-3}			Cmol$_c$.dm^{-3}			(%)		g.kg^{-1}	
5,7	127,0	1246	15,2	5,9	0,2	10,6	69,5	583	206	211

Fonte: Laboratório de Análises de Solo, Adubo e Foliar da Universidade do Estado de Mato Grosso – LASAF.

Foram cultivadas plantas da espécie medicinal (*Calendula officinalis*) visando acompanhar e analisar o seu desenvolvimento até a produção de sementes. O delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, sendo três microrganismos (*Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*), quatro modos de tratamento e quatro repetições.

Os tratamentos utilizados foram:

1- Bacillus subtilis, Doses: (1. Controle – sem tratamento; 2. Inoculação via semente de *B. subtilis* (400 mL/50 kg sementes) ~ 0,08mL/10g sementes; 3. Pulverização foliar de *B. subtilis* (300 mL ha^{-1}) após 50 dias da emergência; 4. Inoculação via semente

associada à pulverização foliar de *B. subtilis* nas dosagens e estádios anteriormente citados).

2 – *Azospirillum brasilense,* Doses: (1. Controle – sem tratamento; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/25 kg sementes) ~ 0,04mL/10g sementes; 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha^{-1}) após 50 dias da emergência; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados);

3 - *Pseudomonas fluorescens,* Doses: (1. Controle – sem tratamento; 2. Inoculação via semente de *P. fluorescens* (400 mL/50 kg sementes) ~ 0,08mL/10g sementes; 3. Pulverização foliar de *P. fluorescens* (300 mL ha^{-1}) após 50 dias da semedura; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *P. fluorescens* nas dosagens e estádios anteriormente citados.

Ressalta-se ainda que para todos os tratamentos (*B. subtilis, A. brasilense* e *P. fluorescens)* foram empregadas repetições de 4 vasos com 2 plantas cada.

As plantas foram cultivadas em vasos de 8 dm^3 e irrigadas por 65 dias. O solo apresentou-se como de boa fertilidade para as necessidades da calêndula, desta forma não houve necessidade de adubação para o plantio. As unidades experimentais foram mantidas com irrigação visando manter a umidade e fornecimento hídrico às plantas ao longo de todo seu desenvolvimento. Foi realizado semanalmente a limpeza dos vasos, com a retirada cuidadosa de eventuais plantas estranhas ao estudo.

Após 28 dias foi realizado o desbaste das plantas mantendo-se duas plantas por vaso após a sua emergência de maneira a deixar somente aquelas que estavam com porte uniforme dentre as demais em cada unidade experimental.

Após 32 dias da semeadura houve a aplicação do fertilizante nitrogenado ureia (46% de N) visando o fornecimento do nutriente na dose equivalente a 50 kg ha^{-1} de N. Sendo dissolvido 50g em 10L de água, aplicando 100mL em cada vaso, enquanto a aplicação foliar com *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* foi realizada 50 dias após a semeadura somente nas plantas de calêndula (*Calendula officinalis*) cujos tratamentos contavam com esse modo de inoculação. Cada produto foi colocado em pulverizador manual e aplicado na parte foliar da planta (Figura 4).

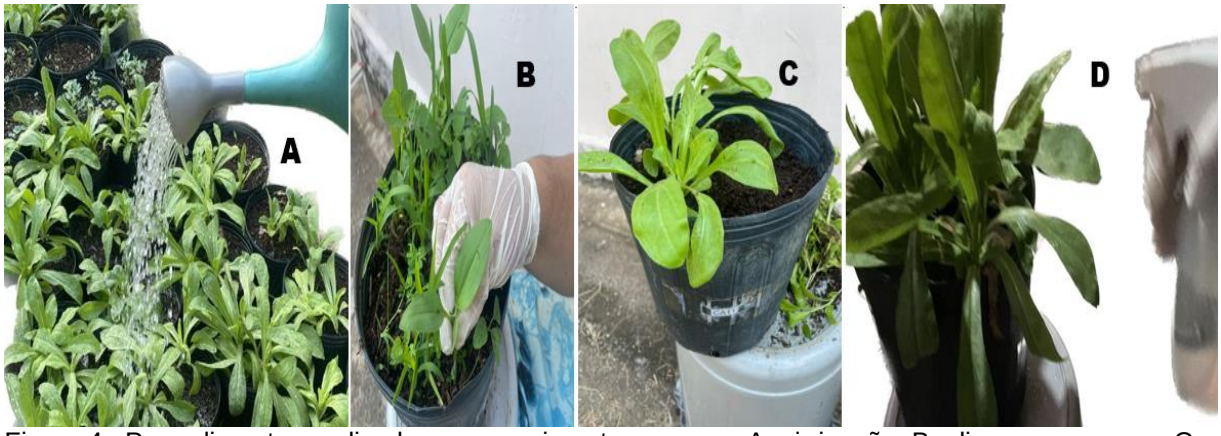

Figura 4. Procedimentos realizados no experimento a campo. A – irrigação; B – limpeza em vaso; C – desbaste de plantas; D - aplicação foliar dos microrganismos. Alta Floresta - MT, 2022.

Todas as plantas receberam a mesma nutrição suplementar durante este estudo para garantir que a diferença destas em relação ao grupo controle fosse em decorrência dos tratamentos com os microrganismos inoculados.

Após 65 dias da semeadura realizou-se a mensuração de cada planta, juntamente com seu registro fotográfico. Após a maturação completa, quando estas atingiram a maturidade fisiológica, as plantas de cada unidade experimental foram coletadas e avaliadas (ABUL-BAKI e ANDERSON, 1973).

Durante a execução do experimento em campo as plantas sofreram ataques de *Icerya purchasi* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Monophlebidae), popularmente conhecido como pulgão branco. Como o presente estudo também analisa os efeitos da inoculação dos promotores de crescimento (*Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*) através da aplicação foliar optou-se não somente por empregar sementes não tratadas, mas também evitar a realização de tratamentos químicos e aplicações de inseticidas para garantir que os resultados obtidos fossem em decorrência da ação dos promotores de crescimentos utilizados. Assim, procedeu-se o experimento em campo e análises posteriores referentes à essa fase, uma vez que esta cultivar já havia completado seu desenvolvimento ainda durante os primeiros ataques.

Nesta fase foram avaliados os seguintes parâmetros: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF), comprimento da raiz (CR), teor de clorofila (TC), quantidade de folhas (QF), quantidade de Flores (QFL), quantidade de botões (QB), quantidade de flores secas (QFLS), total de flores (TFL), massa fresca da folha (MFF), massa fresca do caule (MFC), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca da flor (MFFL), massa fresca total (MFT), massa seca da folha (MSF), massa seca do

caule (MSC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da flor (MSFL), massa seca total (MST).

Para mensurar as variáveis foram usados vários equipamentos (Figura 5). A altura de planta foi determinada aos 65 dias após o plantio com o auxílio de régua graduada, mediu-se da base da planta até o ápice da parte aérea na haste principal. A medida do diâmetro de caule foi obtida com a utilização do paquímetro digital (150mm - DIGIMESS-100170), sendo que a medição foi na base do caule.

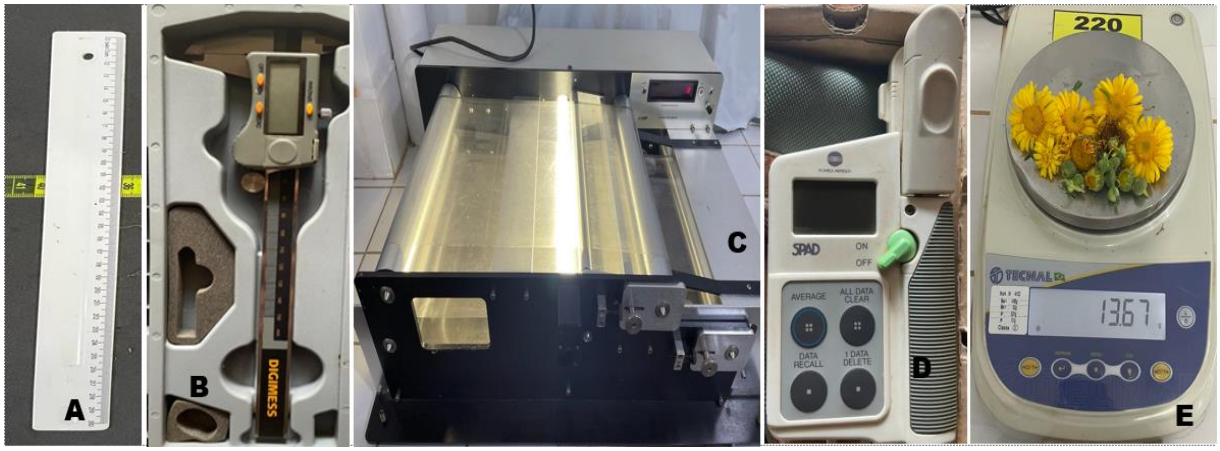

Figura 5. Equipamentos usados para mensurar as variáveis. A – régua graduada; B –paquímetro digital (150mm - DIGIMESS-100170); C - determinador de área foliar (modelo LI 3100, LI-COR®); D - medidor portátil de clorofila SPAD-502; E – balança de precisão. Alta Floresta - MT, 2022.

.

A mensuração de área foliar foi realizada com o auxílio do determinador de área foliar (modelo LI 3100, LI-COR®) e ao mesmo tempo foi realizada a contagem do número de folhas de cada planta. A determinação do teor de clorofila (índice Spad) foi realizada com auxílio de medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta Sensing Americas, Inc.).

Para determinar as variáveis: massa fresca de folha, massa fresca de caule, massa fresca de raiz, massa fresca de flor, foi realizada a pesagem das mesmas em balança de precisão (0,01 g) e posteriormente colocadas em sacos de papel Kraft e acondicionadas por 72 horas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 50ºC. Após esse período determinou-se as variáveis: massa seca de folha, massa seca de caule, massa seca de raiz e massa seca de flor usando uma balança de precisão (0,01 g).

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e quando significativos se aplicou o teste de Tukey (5%) com auxílio do pacote ExpDes do software R.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nos permitem observar, para as sementes de calêndula, o efeito significativo somente para dose em relação ao comprimento da parte aérea na primeira avaliação (A1A) enquanto que as demais variáveis analisadas não ocorreu diferença significativa para os fatores (promotores e doses) e também interação significativa entre os mesmos (Tabela 2).

Tabela 2. Quadrados médios das variáveis: índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G), comprimento da parte aérea na primeira avaliação (A1A), comprimento da raiz na primeira avaliação (R1A), massa fresca na primeira avaliação (MF1A), massa seca na primeira avaliação (MS1A), comprimento da parte aérea na segunda avaliação (A2A), comprimento da raiz na segunda avaliação (R2A), massa fresca na segunda avaliação (MF2A), massa seca na segunda avaliação (MS2A) de sementes de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com diferentes promotores de crescimento e doses destes. Alta Floresta - MT, 2022

Fontes de variação	Quadrado médio				
	IVG	G	A1A	R1A	MF1A
Promotores (P)	4,231^{ns}	112,000^{ns}	0,112^{ns}	0,260^{ns}	0,005^{ns}
Doses (D)	2,370^{ns}	36,777^{ns}	0,243*	0,429^{ns}	0,006^{ns}
P * D	1,352^{ns}	49,778^{ns}	0,064^{ns}	0,311^{ns}	0,001^{ns}
Erro	2,247	104,233	0,062	0,198	0,002
C.V. (%)	20,25	14,75	10,14	15,03	19,77

F. de variação	MS1A	A2A	R2A	MF2A	MS2A
Promotores (P)	0,0001 ^{ns}	0,053 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,013 ^{ns}	0,042 ^{ns}
Doses (D)	0,0009 ^{ns}	0,026 ^{ns}	0,597 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,024 ^{ns}
P * D	0,0013 ^{ns}	0,368 ^{ns}	0,515 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,024 ^{ns}
Erro	0,0009	0,366	0,616	0,010	0,019
C.V. (%)	39,00	19,13	23,57	31,79	25,05

Significativo a 5% (*) e 1% (**) de significância pelo teste de Tukey; ns não significativo; C.V. (%): Coeficiente de variação.

A Figura 6 apresenta o efeito significativo de dose obtendo-se o maior comprimento da parte aérea de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*), na medida que as doses aumentam, independentemente do tratamento utilizado.

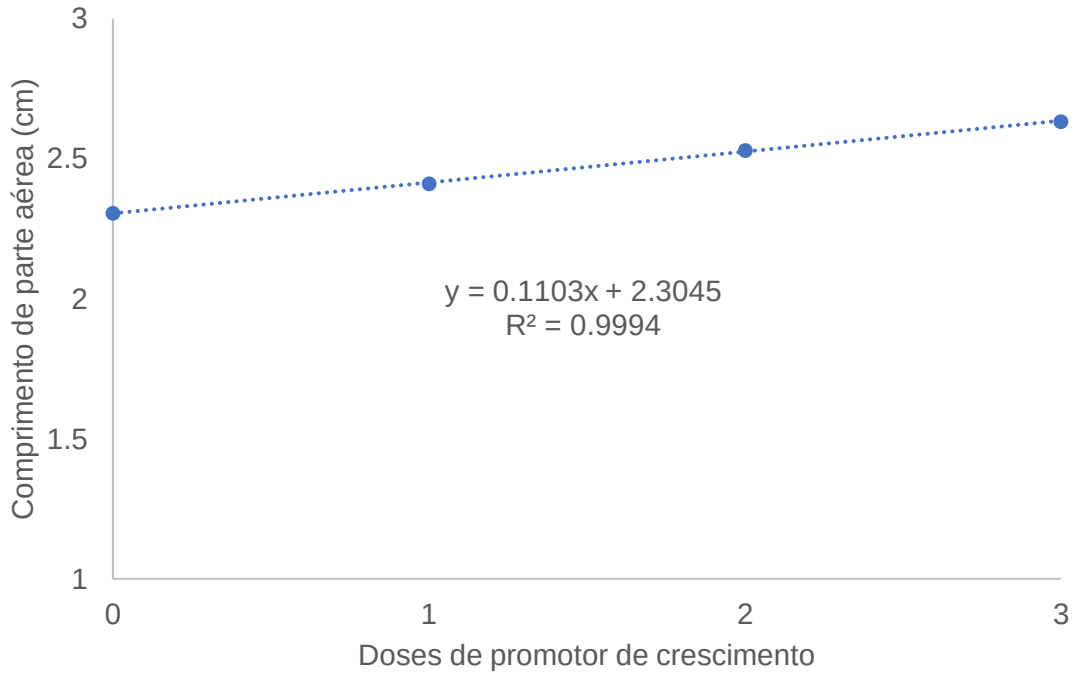

Figura 6. Comprimento da parte aérea de plântulas de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com três diferentes promotores de crescimento, utilizando doses crescentes destes. Alta Floresta - MT, 2022.

Resultado semelhante foi obtido por Lemos, Rodriguez e Alves (2020) que ao inocular *Azospirillum brasilense* na cultura do milho observaram que a aplicação da maior dose estudada (200 $mLha^{-1}$) foi a que apresentou resultados superiores para o parâmetro altura de planta, enquanto que para as demais variáveis analisadas não houve efeito significativo.

Uma possível explicação para isso é apontada por Ludwig *et al.* (2018) que ao inocularem sementes de trigo (*Triticum aestivum)* com *Azospirillum brasilense* observaram baixa influência dessa inoculação. Segundo esses autores isso se explica pelo fato de que no período inicial, a plântula estava sendo nutrida pelas reservas da semente, ou seja, sendo dependente da quantidade de reservas acumuladas pela planta mãe e que as respostas obtidas à inoculação dessa bactéria variam de acordo com a cultivar analisada. Uma vez que a colonização por essa bactéria provoca efeitos diferentes de acordo com as especificidades de cada cultivar.

Com relação aos resultados obtidos no experimento com a calêndula, onde suas sementes foram plantadas em vasos e tratadas com diferentes promotores de crescimento e modos de aplicação, observou-se os primeiros botões florais aos 55 dias após a semeadura, com a formação dos primeiros botões em dois vasos de

calêndula inoculadas com *Bacillus subtilis*, um vaso com *Azospirillum brasilense* e um com *Pseudomonas fluorescens.* (Figura 7).



Figura 7. A e B – Plantas inoculas com as bactérias *Bacillus subtilis*; C – planta inocula com *Azospirillum brasilense*; D - planta inocula com P*seudomonas fluorescens.,* após três dias da aplicação foliar. Alta Floresta - MT, 2022.

De acordo com os resultados obtidos da análise das variáveis, observa-se que houve efeito significativo para o fator promotores de crescimento em relação ao comprimento da raiz (CR), quantidade de flores (QFL) e massa fresca da flor (MFFL). Por outro lado, para as variáveis massa fresca da raiz (MFR) e massa seca da raiz (MSR) os efeitos significativos encontrados foram em relação aos diferentes modos de aplicação. Para o Teor de Clorofila (TC) interação entre promotores de crescimento e modos de aplicação. Enquanto para as demais variáveis analisadas não houve diferença significativa para os fatores individuais e interação entre os mesmos (Tabela 3).

Tabela 3. Quadrados médios das variáveis: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF), comprimento da raiz (CR), total de clorofila (TC), quantidade de folhas (QF),quantidade de flores (QFL), quantidade de botões (QB), quantidade de flores secas (QFLS), total de flores (TFL), massa fresca da folha (MFF), massa fresca do caule (MFC), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca da flor (MFFL), massa fresca total (MFT), massa seca da folha (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da flor (MSFL), massa seca total (MST) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*) tratadas com diferentes promotores de crescimento e modos de aplicação. Alta Floresta - MT, 2022

Fontes de variação	Quadrados médios									
	AP	DC	AF	CR	TC	QF	QFL	QB	QFLS	TFL
Promotores (P)	6,2708ns	1,101ns	28016ns	205,146*	10,386*	331,270ns	21,583*	1,937ns	0,25ns	11,520ns
Modos (M)	145,687ns	1,843ns	31179ns	63,491ns	13,655*	476,465ns	2,354ns	3,354ns	0,021ns	2,576ns
P * M	123,687ns	1,232ns	29123ns	27,789ns	6,277*	379,548ns	3,583ns	7,354ns	3,916ns	27,993ns
Erro	77,298	1,439	29351	35,932	1,766	808,909	3,645	3,729	2,256	20,923
C.V. (%)	17,9	15,44	29,45	17,28	3,18	32,37	94,49	52,37	184,9	70,15
	MFF	MFC	MFR	MFFL	MFT	MSF	MSC	MSR	MSFL	MST
Promotores (P)	218,843ns	67,487ns	9,731ns	37,280*	1023,133ns	0,371 ns	0,597ns	0,052ns	0,257ns	2,574ns
Modos (M)	76,061ns	3,497ns	44,057*	1,882ns	228,076ns	1,186ns	0,212ns	0,522*	0,010ns	3,446ns
P * M	45,559ns	68,056ns	6,047ns	4,055ns	143,411ns	0,263ns	0,768ns	0,217ns	0,068ns	2,847ns
Erro	218,875	69,377	6,538	4,076	493,783	1,064	0,854	0,119	0,084	3,931
C.V. (%)	36,17	35,05	35,26	47,66	29,18	32,47	42,85	38,35	53,81	29,16

Significativo a 5% (*) e 1% (**) de significância pelo teste de Tukey; ^{ns} não significativo; C.V. (%): Coeficiente de variação.

A Figura 8 apresenta o efeito significativo para o fator promotores de crescimento em relação ao comprimento da raiz (CR) de plantas de calêndula. Avaliando-se os promotores de crescimento (*B. subtilis, A. brasilense* e *P. fluorescens*) referente ao comprimento de raiz observa-se que o maior comprimento foi obtido com a aplicação de *B. subtilis*, que não difere estatisticamente do resultado obtido com a aplicação de *P. fluorescens* mas é superior aos resultados em relação à aplicação com *A. brasilense*.

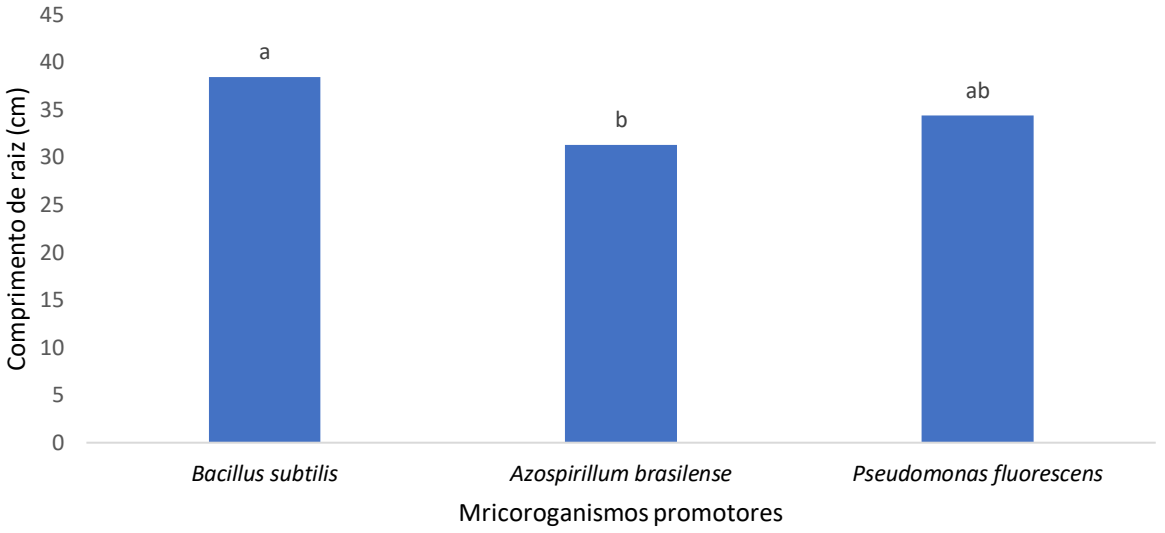

Figura 8. Efeito de promotores de crescimento em relação ao comprimento da raiz (CR) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis.*). Alta Floresta - MT, 2022.

Os resultados obtidos com a inoculação com *Bacillus subtilis* corroboram o estudo de Tahir *et al*. (2017), no qual esses autores identificaram após a inoculação em tomateiros aumento do peso fresco, do peso seco, da área folear, do comprimento do caule e das raízes, bem como da atividade de fotossíntese. Os mesmos autores atribuem esse resultado a um aumento no teor de fitormônios como giberelina (GA20ox-1), auxina (SlIAA1 e SlIAA3), e citocinina (SlCKX1) observado nas plantas inoculadas. Dentre outras funções, esses hormônios desempenham um importante papel no processo de crescimento e desenvolvimento vegetal. As Giberelinas compõem uma classe de fitormônios que regulam aspectos como a germinação das sementes, prolongamento do caule, maturação dos pólens, expansão das folhas, além do próprio desenvolvimento de flores, frutos e sementes (GAO; CHU, 2020).

A Auxina, por sua vez, corresponde a um grupo de compostos orgânicos e sintéticos com certas propriedades que regulam o crescimento e que são conhecidos por estimular a divisão celular e alongamento, a iniciação da raiz lateral, dominância apical, resposta trópica e a diferenciação do tecido vascular. Além disso, ela está associada com quase todos os estágios do ciclo de vida vegetal desempenhando papel vital nas respostas da planta à dinâmica do meio ambiente de forma a garantir melhor crescimento e sobrevivência (MISHRA; SHARMA; LAXMI, 2021).

A Citocinina desempenha diversos papeis ao longo do processo de desenvolvimento vegetal influenciando muitos processos importantes como o crescimento, as respostas aos nutrientes e ao stress biótico e abiótico (KIEBER; SCHALLER, 2018).

A Figura 9 apresenta o desdobramento do efeito significativo para o fator promotores de crescimento em relação à quantidade de flores (QFL) de plantas de calêndula submetidas a diferentes modos de tratamento. Ao avaliar os três promotores de crescimento *(B. subtilis, A. brasilense* e *P. fluorescens*) com relação à quantidade de flores (QFL) observa-se que o maior resultado foi obtido com a aplicação de *B. subtilis*, que não difere estatisticamente do resultado obtido com a aplicação de *A. brasilense,* mas é superior aos resultados em relação à aplicação com *P. fluorescens*.

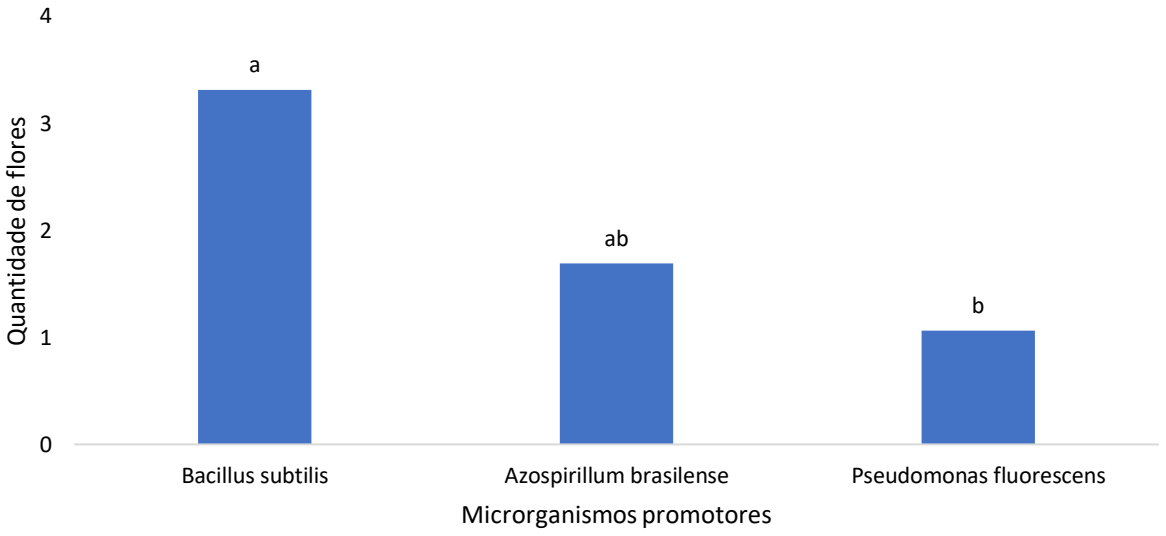

Figura 9. Efeito significativo para o fator promotores de crescimento em relação à quantidade de flores (QFL) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.

É importante destacar essa variável porque é justamente a flor da calêndula que tem sido comercializada até mesmo em farmácias por suas propriedades medicinais. Assim, para o produtor que visa a exploração comercial desta cultivar seja

para fins medicinais quanto para fins gastronômicos é importante estar atento não somente ao vigor das plantas, mas também à quantidade de flores produzidas e o seu peso.

A Figura 10 apresenta o efeito do fator promotores de crescimento (*Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens)* em relação a massa fresca de flores (MFFL) de plantas de calêndula.

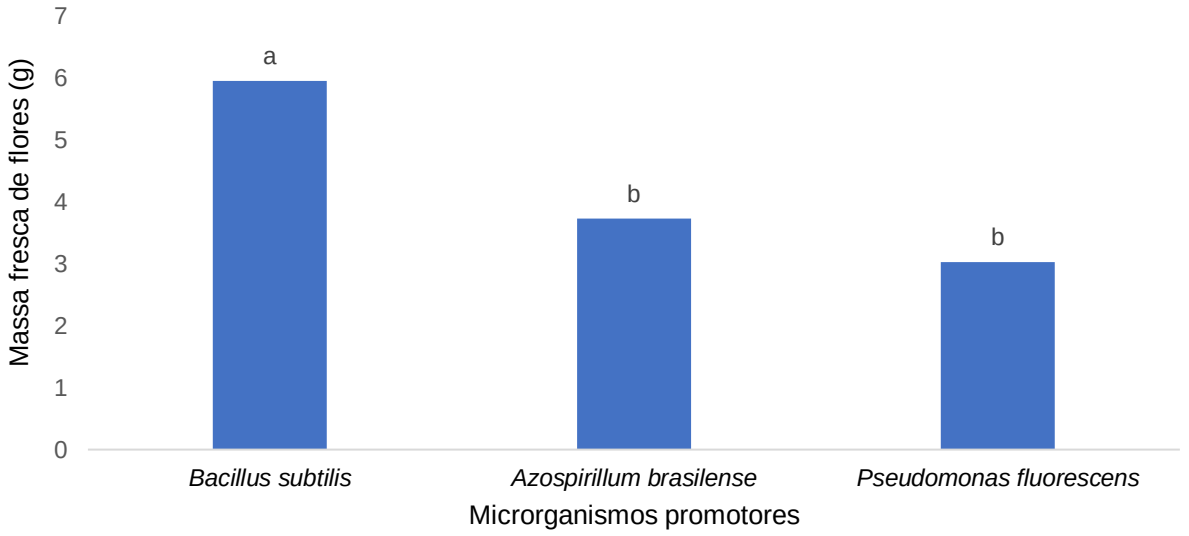

Figura 10. Efeito do fator promotores de crescimento referentes a massa fresca de flores (MFFL) de calêndula (*Calendula officinalis.*). Alta Floresta - MT, 2022.

Referente aos promotores de crescimento em relação à massa fresca de flores (MFFL) observa-se que a aplicação de *B. subtilis* influenciou positivamente, proporcionando maior quantidade de massa fresca, obtendo um resultado estatisticamente superior aqueles obtidos com a aplicação dos demais promotores.

A Figura 11 apresenta o efeito do fator modos de aplicação referentes a Massa fresca de raiz de plantas de calêndula com diferentes microrganismos promotores de crescimento. Avaliando-se as diferentes condições e modos de aplicação: na ausência de aplicação de microrganismos promotores (TEST), com o tratamento somente nas sementes (SEM), na aplicação foliar (FOL), bem como no tratamento realizado nas sementes e posterior aplicação foliar (SEM+FOL) referente a massa fresca de raiz, observa-se que o melhor resultado foi obtido quando os microrganismos foram aplicados nas sementes e via foliar obtendo-se maior quantidade de massa fresca, sendo estatisticamente superior aos demais resultados observados.

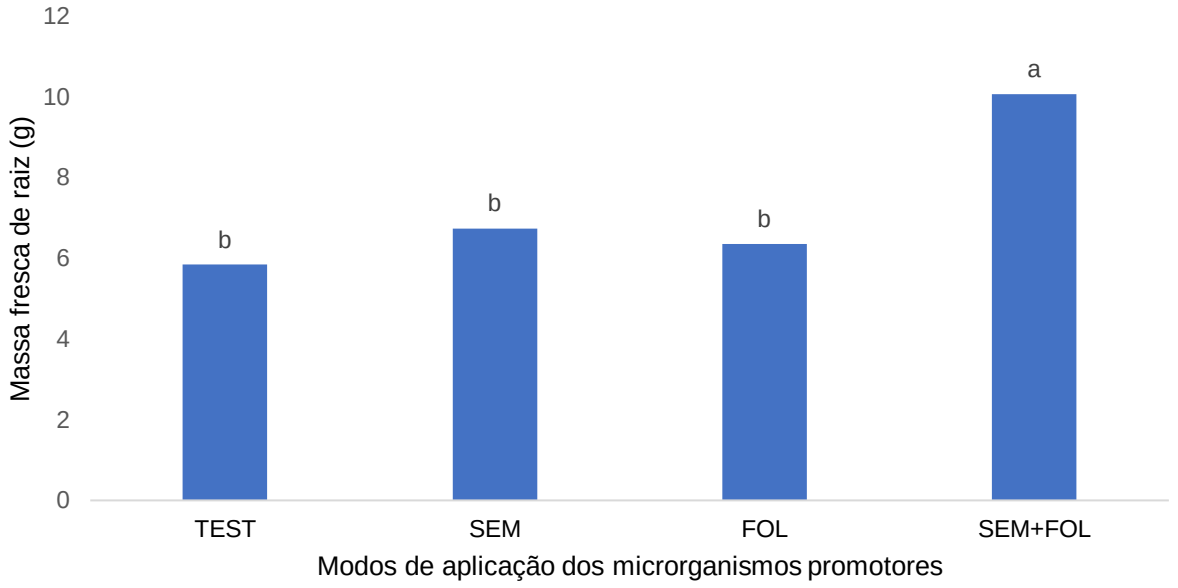

Figura 11. Efeito significativo do fator modos de aplicação para a massa fresca de raiz (MFR) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.

A Figura 12 apresenta o efeito do fator modos de aplicação referentes à massa seca de raiz (MSR) de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*), com diferentes microrganismos promotores de crescimento sob diferentes condições de aplicação. Observa-se que o melhor resultado foi obtido quando os microrganismos foram aplicados nas sementes e via foliar (SEM+FOL) obtendo-se uma quantidade de massa seca de raiz superior estatisticamente aos resultados obtidos com os demais modos de aplicação.

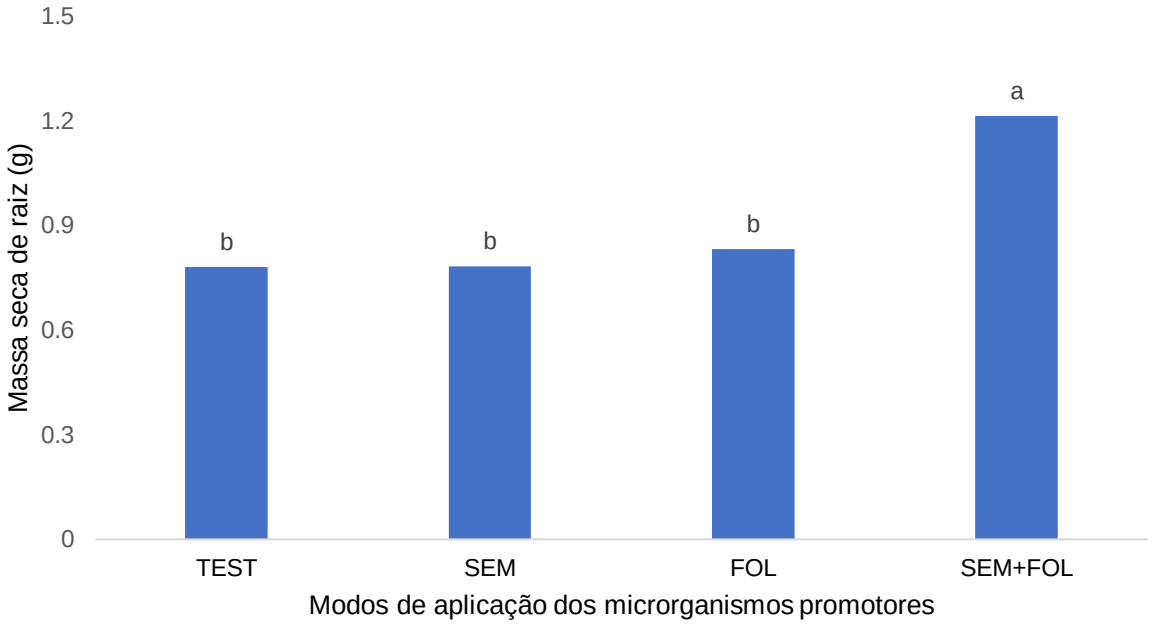

Figura 12. Efeito do fator significativo modos de aplicação referentes à massa seca de raiz (MSR) de calêndula (*Calendula officinalis*). Alta Floresta - MT, 2022.

Resultado semelhante foi obtido por Filipini *et. al* (2020) ao inocularem plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* tanto nas sementes, isoladamente ou em combinação, e associados ou não à inoculação foliar. Esses autores reportaram que as plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* nas sementes e com aplicação foliar apresentaram valores de massa do caule 29% e quantidade de nitrogênio 22% superior ao das plantas que haviam sido inoculadas apenas uma vez, seja somente na semente ou somente na aplicação foliar. Além disso, a produtividade de grãos dessas plantas foi 20% superior àquela registrada pelas plantas do grupo controle.

Pereira *et. al* (2017) avaliam diferentes dosagens e modos de aplicação (via sementes, aplicação foliar e no sulco de sementeira) da forma líquida de um inoculante à base de *Azospirillum brasilense* na cultura do trigo (*Triticum aestivum*). Embora diferindo nos modos de inoculação em relação ao presente trabalho, esses autores observaram que independentemente do método de inoculação, a inoculação dessa bactéria proporcionou resultados benéficos ao rendimento da cultura. Mas ressaltam que a aplicação via tratamento de sementes com a dose total de N em cobertura foi a combinação que proporcionou o maior incremento da produtividade de grãos.

A Figura 13 exibe o desdobramento da interação significativa entre os fatores promotores de crescimento e modos de aplicação referentes ao teor de clorofila (TC)

aos 65 dias após o plantio em vasos. De acordo com os resultados, observa-se que o maior teor obtido tanto com a inoculação de *Bacillus subtilis* quanto de *Pseudomonas fluorescens* foi através de sua aplicação via foliar. Enquanto que o maior teor com a inoculação de *Azospirillum brasilense* foi obtido com a combinação da aplicação nas sementes e via foliar. Com relação aos diferentes modos de aplicação os dois melhores resultados foram através da aplicação foliar (FOL), e o tratamento das sementes e aplicação foliar (SEM+FOL).

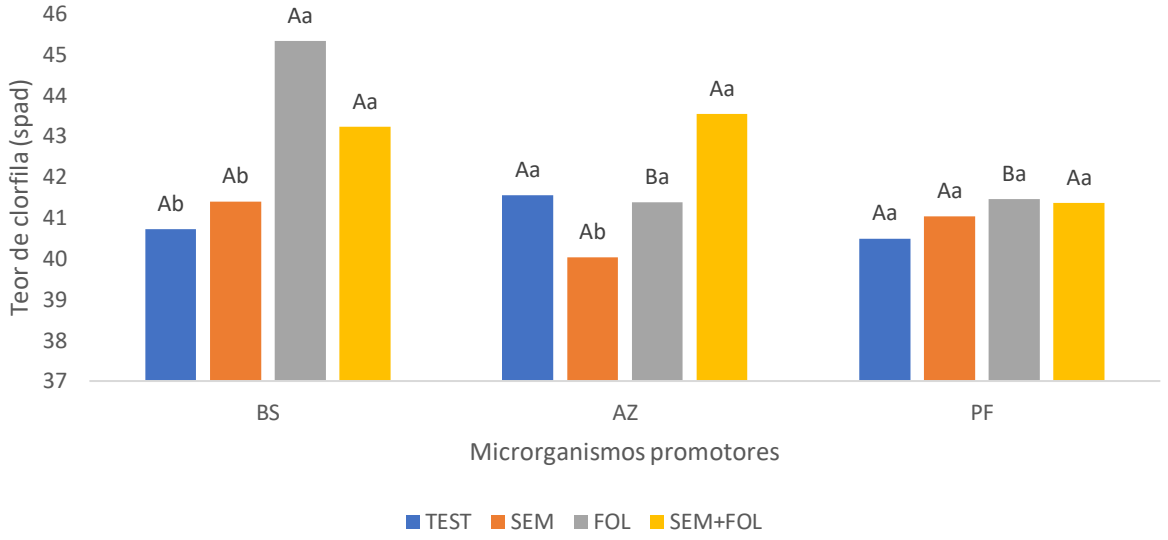

Figura 13**.** Teor de clorofila (spad) de folhas de plantas de calêndula (*Calendula officinalis*), submetidas a tratamento com *Bacillus subtilis* (BS), *Azospirillum brasilense* (AZ) e *Pseudomonas fluorescens* (PF), sob diferentes condições de aplicação: TEST (ausência de aplicação de microrganismos promotores), SEM (tratamento das sementes), FOL (aplicação foliar), SEM+FOL (tratamento das sementes e posterior aplicação foliar). Colunas seguidas de mesma letra minúscula entre os tratamentos dentro dos microrganismos promotores e mesma letra maiúscula entre os microrganismos promotores dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Alta Floresta - MT, 2022.

Resultado semelhante foi obtido por Tao *et al.* (2019) ao analisarem os efeitos da inoculação de *Bacillus subtilis* em pimenteiras plantadas em vasos, onde as plantas inoculadas foram as que apresentaram maiores níveis de clorofila do que as plantas do grupo controle. Os mesmos autores afirmam que isso pode ser explicado pelo fato de que como a fotossíntese é em grande parte regulada pelo estímulo de sinais endógenos e pelo ambiente, seria provável assumir que *B. subtilis* possa regular os caminhos de transmissão dos sinais que estão relacionados com a fotossíntese.

Os resultados obtidos neste estudo se juntam ao trabalho de diversos pesquisadores não somente no esforço de compreender os efeitos da inoculação das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, mas também contribui para a criação de protocolos de aplicação que sejam adequados às características e especificidades das cultivares analisadas de acordo com os critérios de interesse de possíveis produtores, pesquisadores e de toda comunidade científica interessada.

Conclusões

A inoculação com as bactérias promotoras de crescimento *Bacillus subtillis, Azospirillum brasilense e Pseudomonas fluorescens* constituem uma alternativa viável para aumentar o desempenho agronômico da calêndula (*Calendula officinalis*). A inoculação com *Bacillus subtilis*, foi a que mais forneceu quantidade de massa fresca da flor, quantidade de flor e maior comprimento da raiz da calêndula. O modo de tratamento com a combinação da inoculação nas sementes e aplicação via foliar foi o que mais forneceu quantidade de massa fresca e seca de raiz. Os resultados obtidos corroboram o uso das bactérias analisadas como agentes biológicos de promoção de crescimento das plantas de calêndula.

Referências Bibliográficas

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Vigor Determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Science**, v.13, n.6, p.630-633,1973.

ASHWLAYAN, V.D.; KUMAR, A.; VERMA, M.; GARG, V.K.; GUPTA, S.K. Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. **Pharmacy & Pharmacology International Journal, 6:**149-155, 2018.

AYAZ, M.; ALI, Q.; FARZAND, A.; KHAN, A.R.; LING, H.; GAO, X. Nematicidal volatiles from *Bacillus atrophaeus* GBSC56 promote growth and stimulate induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, n.22, p.1-19, 2021.

BATABYAL, B. Azospirillum: diversity, distribution, and biotechnology applications. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences,**12:17-25, 2021.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M.N.; KOVÁCS, A.T. Molecular aspects of plant growth promotionand protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 34:15-25, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.

CARDOSO, E.J.B.N.; ESTRADA-BONILLA, G.A. Inoculantes agrícolas. In: LIMA, U.A. (org.). **Biotecnologia Industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2019. 616p.

DAVID, B.V.; CHANDRASEHAR, G.; SELVAM, P.N. Pseudomonas fluorescens: a plant-growth-promoting rhizobacterium (pgpr) with potential role in biocontrol of pests of crops. In: PRASAD, R.; GILL, S.S.; TUTEJA, N.(ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**: **crop improvement through microbial biotechnology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 221-243.

DENNIS, C.; Webster J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma. II. Production of non-volatile antibiotic. **Transactions British Mycological Society,** v.57, n. 1, p.41-48, 1971.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p.109-112, 2014.

FILIPINI, L.D.; PILATTI, F.K.; MEYER, E.; VENTURA, B.S.; LOURENZI, C.R.; LOVATO, P.E. Application of Azospirillum on seeds and leaves, associated with Rhizobium inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives Of Microbiology,** v.203, n.21, p.1033-1038, 2020.

GAO, S.; CHU, C. Gibberellin metabolism and signaling: targets for improving agronomic performance of crops. **Plant Cell Physiology,** v.61, n.11**,** p.1902-1911, 2020.

KANG, S.M.; HAMAYUN, M.; KHAN, M.A.; IQBAL, A.; LEE, I.J. *Bacillus subtilis* JW1 enhances plant growth and nutrient uptake of Chinese cabbage through gibberellins secretion. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 92:172-178, 2019.

KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E. Cytokinin signaling in plant development. **The Company of Biologists, v.145, n.4,** p.1-7, 2018.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Classificação climática de Köppen-Geiger**. Climate-Date.Org. 2021. Disponivel em: https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/mato-grosso/alta-floresta-4078/. Acesso em:09 de Jun. 2021.

KOVÁCS, A.T. *Bacillus subtilis*. **Trends In Microbiology**, 27:724-725, 2019.

LEMOS, E.F.; RODRIGUEZ, A.P.R.M.; ALVES, T.L. Doses e modo de aplicação de inoculante com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Revista Ciência Et Praxis**, Passos, v. 13, n. 26, p. 83-94, jun. 2020.

LUDWIG, R.L.; MARTIN, T.N.; STECCA, J.D.L.; CUNHA, V.S.; NUNES, U.R.; GRANDO, L.F.T. Action specificity of chemical treatment and inoculation with *Azospirillum brasilense* in wheat seed on the crop initial growth. **Ceres**, v. 65, n. 5, p. 407-414, 2018.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-77, 1962.

MAHAPATRA, S.; YADAV, R.; RAMAKRISHNA, W. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. **Journal of Applied Microbiology**, 132:3543-3562, 2022.

MISHRA, B.S.; SHARMA, M.; LAXMI, A. Role of sugar and auxin crosstalk in plant growth and development. **Physiologia Plantarum,** v.174, n.1, p.1-21, 2021.

NEPALI, B.; BHATTARAI, S.; SHRESTHA, J. Identification of Pseudomonas fluorescensusing different biochemical tests. **International Journal of Applied Biology**, 2:27-32, 2018.

PEREIRA, L.C.; PIANA, S.C.; BRACCINI, A.L.; GARCIA, M.M.; FERRI, G.C.; FELBER, P.H.; MARTELLI, D.C.V.; BIANCHESSI, P.A.; DAMETTO, I.B. Rendimento do trigo (*Triticum aestivum*) em resposta a diferentes modos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p.105-113, 2017.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, p. 1-31, 2021.

SAUPE, S.G. **Germination Rates & Percentages**. 2009. Disponível em:https://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/Lab/Seeds/germination_percentage.htm. Acesso em: 30 jun. 2021.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Essentia herba**: plantas bioativas. 1 ed. Florianópolis: Epagri, 2006. v. 1, 599 p.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; RAZA, W.; HANIF, A.; WU, L.; COLMAN, M.V.; GAO, X. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers In Microbiology**, v.8, n. 171, p.1-11, 2017.

TAO, S.; WU, Z.; WEI, M.; LIU, X.; HE, Y.; YE, B.C. *Bacillus subtilis* SL-13 biochar formulation promotes pepper plant growth and soil improvement. **Canadian Journal Of Microbiology**, 65:1-35, 2019.

TARRAND, J.J.; KRIEC, N.R.; DOBEREINE, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and. **Canadian Journal Of Microbiology**, 24:967-980, 1978.

TEITEN, M.H.; GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions.**Biochemical Pharmacology**, 86:1239-1247, 2013.

TOFFOLI, L.M.; MARTÍNEZ-ZAMORA, M.G.; MEDRANO, N.N.; FONTANA, C.A.; LOVAISA, N.C.; DELAPORTE-QUINTANA, P.; ELIAS, J.M.; SALAZAR, S.M.; PEDRAZA, R.O. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in petunia with capacity to improve plant growth and flowering. **Journal Of Basic Microbiology**, 61:662-673, 2021.

VAZ, A.P.A.; JORGE, M.H.A. **Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**: calêndula. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006.

3.2 RESPOSTAS ANATÔMICAS DE *Calendula officinalis* L. MEDIADAS POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

Resumo – (Respostas anatômicas de *Calendula officinalis* L. mediadas por bactérias promotoras de crescimento). As plantas medicinais vêm desempenhando ao longo dos anos um importante serviço à humanidade. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde 88% da população mundial faz uso de plantas medicinais para ao menos um de seus cuidados de saúde primária. Dentre as plantas medicinais conhecidas o presente capítulo analisa *Calêndula officinalis* que é uma planta herbácea, anual, nativa da região Mediterrânea que pertencente à família *Asteraceae*. Neste estudo, identificamos respostas anatômicas da folha, caule e raiz de calêndula utilizando três bactérias promotoras de crescimento, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* e diferentes modos de aplicação a fim de determinar a influência das bactérias e dos modos de aplicação na espécie estudada. Amostras da região mediada da folha, caule e raiz de calêndula *com Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis e Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente e por pulverização foliar foram coletadas e processadas por técnicas usuais em anatomia vegetal. As principais respostas anatômicas foram observadas no tamanho das células epidérmicas, estômatos, formato e tamanho das células do parênquima paliçádico e lacunoso, quantidade de camadas de parênquima paliçádico e lacunoso, formato da nervura central, tamanho do sistema vascular, tamanho do caule, formato do caule, tamanho do córtex e da medula, tamanho da raiz e do sistema vascular. Observou-se respostas de crescimento especificas de cada órgão vegetativo em função da ação de cada bactéria. Tais informações, mostram que as bactérias influenciam no crescimento de *Calendula officinalis* com respostas anatômicas específicas entre os órgãos vegetativos e consequentemente pode promover inúmeros benefícios para o cultivo desta planta que é amplamente utilizada por suas propriedades medicinais. Entre os benefícios destacamos o aumento da disponibilidade de nutrientes, produção de hormônios, indução sistêmica ou controle direto de pragas e patógenos, acarretando um incremento do crescimento vegetal e consequentemente uma maior produtividade.

Palavras chave: Calêndula; caracteres anatômicos; rizobactérias.

Abstract – (Anatomical responses of *Calendula officinalis* L. mediated by growth-promoting bacteria). Medicinal plants have been performing a paramount service to humanity over the years. According to estimates by the World Health Organization, 88% of the world's population uses medicinal plants for at least one of their primary healthcare activities. Among the known medicinal plants, this chapter analyzes *Calendula officinalis*, an annual herbaceous plant native to the Mediterranean region, belonging to the Asteraceae family. In this study, we identified anatomical responses of the leaf, stem, and root of *Calendula officinalis* using three growth-promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas fluorescens*, and different application modes to determine the influence of the bacterias and forms of application on the analyzed specie. Samples from the middle region of the leaf, stem, and root of three Calendula officinalis individuals with *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas fluorescens* seed and foliar inoculated were collected and processed by usual techniques in plant anatomy. The main anatomical responses observed was in the size of epidermal cells, stomata, shape and size of cells in the palisade and spongy parenchyma, number of palisade layers and spongy parenchyma, the midrib 'shape, the size of the vascular system, the shape and size of the stem, size of cortex and medulla, and the size of root and vascular system. Specific growth responses of each vegetative organ were observed as a function of the action of each bacterium. Such information shows that bacteria influence the growth of *Calendula officinalis* with specific anatomical responses between the vegetative organs and can promote numerous benefits for the cultivation of this widely used plant for its medicinal properties. Among the benefits, we highlight the increase in the availability of nutrients, hormone production, systemic induction, or direct control of pests and pathogens, increasing plant growth and greater productivity.

Key-words: Anatomical characters; Calendula; rhizobacteria.

Introdução

Segundo os dados do Centro Global da Organização Mundial de Saúde para a Medicina Tradicional (WHO GLOBAL CENTRE FOR TRADITIONAL MEDICINE, 2023), 88% da população mundial faz uso de plantas medicinais para ao menos um de seus cuidados de saúde primária. Esse tipo de medicina tem sido um recurso integral para centenas de povos ao redor do mundo, sendo um esteio para aqueles que sofrem com a desigualdade do acesso à medicina convencional. Dentre as diversas plantas medicinais conhecidas destaca-se a *Calendula officinalis* que ao longo dos anos vem sendo utilizada por diversas civilizações, sendo até mesmo usada durante a guerra civil americana e na primeira guerra mundial como bálsamo, creme e como agente antisséptico e anti-inflamatório por suas propriedades cicatrizantes (ABDELWAHAB *et al*., 2022).

A Calêndula é uma planta herbácea, anual e nativa da região Mediterrânea que pertencente à família *Asteraceae* (ARORA *et al*., 2013). Essa família é uma das maiores e mais fenotipicamente diversas famílias de angiosperma com aproximadamente 24.700 espécies, o que equivale a 10% de todas as plantas floridas (CHRISTENHUSZ; FAY; CHASE, 2017). Com considerável relevância econômica e ecológica, essa família está distribuída ao redor do mundo, estando presente em habitats que se estendem desde desertos até pântanos e de florestas de várzeas até a tundra alpina (JAN *et al*., 2017; PALAZZESI *et al*., 2022).

Essa planta possui haste hispidamente pubescente e ramificada, folhas simples, híspidas, agudas, lanceoladas, alternadas e sésseis de 6 a 12 cm de comprimento (LORENZI & MATOS, 2021). Suas flores são amarelas ou alaranjadas dispostas em capítulos terminais grandes; a espécie apresenta uma longa raiz principal com numerosas raízes secundárias e sua multiplicação ocorre por sementes (GAZALA *et al*., 2018; ABDELWAHAB *et al*., 2022).

As plantas abrigam uma diversidade de bactérias em diferentes órgãos vegetativos, reprodutivos e tecidos vegetais, incluindo folhas, caules, raízes, sementes e frutos (RYAN *et al*., 2008; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). As bactérias endofíticas também contribuem para o crescimento e desenvolvimento das plantas por meio do controle biológico, de efeitos promotores de crescimento, atividade endofítica de fixação de nitrogênio, dentre outras ações (BENEDUZI *et al*., 2013; TAURIAN *et al*., 2010). Assim, as associações planta-bactéria ganharam nos últimos anos um olhar

mais aguçado por suas potenciais aplicações biotecnológicas, fazendo com que seja crucial entender a diversidade de bactérias associadas as plantas e suas relações nos órgãos e tecidos das plantas (COMPANT *et al*., 2011; QIN *et al*., 2014).

Na literatura existem estudos que comprovam a ação de bactérias como *Bacillus subtilis* (GASHASH *et al*., 2022), *Azospirillum brasilense* (SANTOS *et al.,* 2022) e *Pseudomonas fluorescens* (CARDOSO *et al.*, 2019) em alterar a anatomia de órgãos e tecidos em diferentes cultivares. Essas alterações nos padrões de crescimento não envolvem apenas mudanças anatômicas, mas também fisiológicas que por sua vez influenciam a qualidade dos produtos vegetais. Essas informações são carentes em todos esses aspectos, principalmente no que se refere às plantas medicinais, em especial *Calendula officinalis*. Neste sentido, busca-se identificar anatomias da folha, caule e raiz de *Calendula officinalis* utilizando três bactérias promotoras de crescimento, *Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* e diferentes modos de aplicação a fim de determinar a influência de cada bactéria e o modo de aplicação na anatomia da espécie estudada.

Material e Métodos

Área de estudo

As plantas foram cultivadas a campo em vasos em agosto de 2022 e após 65 dias de semeadura foram coletados e levados até o Laboratório de Anatomia Vegetal (LAAV) localizado na Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta, para a realização da anatomia da espécie durante os meses de outubro a dezembro de 2022 (Figura 1).

Essas plantas foram submetidas a inoculação com os três microrganismos: *Bacillus subtilis, Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*. O estudo anatômico foi com os seguintes tratamentos: 1. Controle – sem tratamento; 2. Inoculação via semente; 3. Pulverização via foliar após 50 dias da emergência. Buscando-se verificar a existência de diferenças anatômicas provocadas pela inoculação dos mesmos.



Figura 1. A e B - Equipamentos e móveis do Laboratório de Anatomia vegetal e os recipientes plásticos contendo as amostras de folha, caule e raiz sobre o balcão. Alta Floresta – MT, 2022.

Preparação e fixação das amostras

Para obtenção de material foram coletadas amostras da região mediada de folhas, caules e raízes das plantas. As amostras foram lavadas com água destilada e acondicionadas durante 72 horas em solução fixadora FAA (proporção 1:1:18 de formol/ácido acético glacial/álcool etílico 50%). Após este período, foram transferidas para solução de álcool etílico 70% para armazenamento (JOHANSEN, 1940a).

Cortes histológicos

Os cortes histológicos foram realizados com amostras da região mediana de folhas, caules e raízes de *Calendula officinalis*. As amostras foram acondicionadas durante 72 horas em solução fixadora FAA e posteriormente transferidas para solução de álcool etílico 70% para armazenamento. Os cortes transversais foram realizados manualmente com o auxílio de lâminas descartáveis. Após feitos os cortes, os mesmos foram clarificados com a solução de hipoclorito de sódio a 2% e lavados com água destilada e submetidos aos corantes azul de Astra e fucsina básica. Para a análise da epiderme utilizou-se o método de dissociação modificado de Jeffrey (JOHANSEN, 1940b). Com as secções anatômicas coradas montou-se lâminas histológicas, que foram documentadas em foto microscópio Leica® ICC50 nas objetivas de 04X, 10X e 40X (Figura 1). A descrição dos caracteres anatômicos foi baseada na metodologia segundo Esau e Evert (2013) e Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2022).

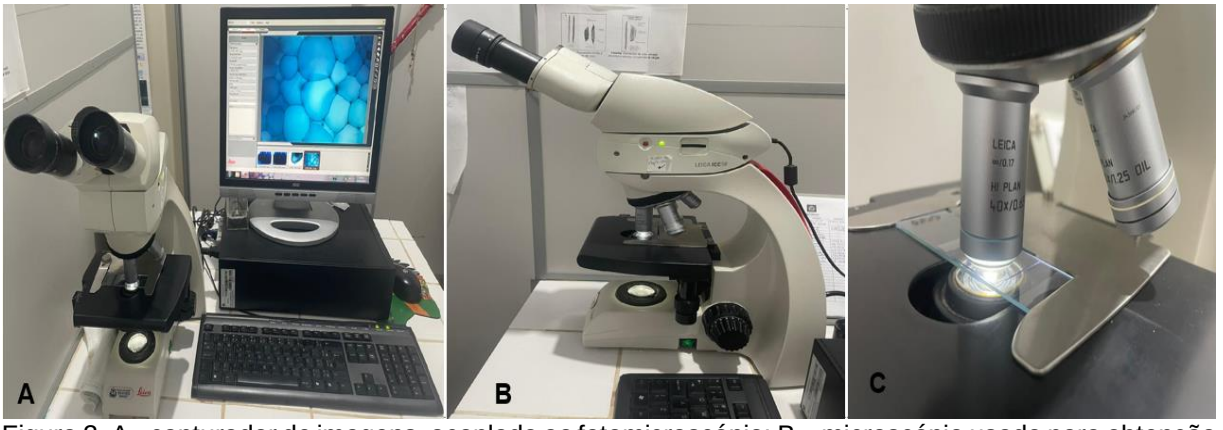

Figura 2**.** A - capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio; B – microscópio usado para obtenção das imagens analisadas; C – lâmina sendo observada. Alta Floresta - MT, 2022.

Resultados e Discussão

Em vista frontal, as folhas de *Calendula officinalis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* via foliar apresentaram células epidérmicas maiores na superfície adaxial quando comparadas com as amostras inoculadas via semente (Fig. 3b, f, c, g). Nas amostras inoculadas via semente as células epidérmicas são maiores apenas em *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 3d).

Resultado parecido foi obtido por Santos *et al.* (2022) ao avaliarem o efeito da inoculação de *A. brasilense* em plantas de *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum Shinn*.). Com base nos resultados obtidos esses autores afirmaram que as plantas inoculadas apresentaram células epidérmicas maiores do que às das plantas do grupo testemunha.

As folhas de *Calendula officinalis* inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* via semente apresentam células epidérmicas maiores quando comparadas com todas as amostras foliares inoculadas via foliar (Fig. 3d, h). Entre as bactérias, as células epidérmicas e os estômatos são maiores nas amostras de *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente (Fig. 3d).

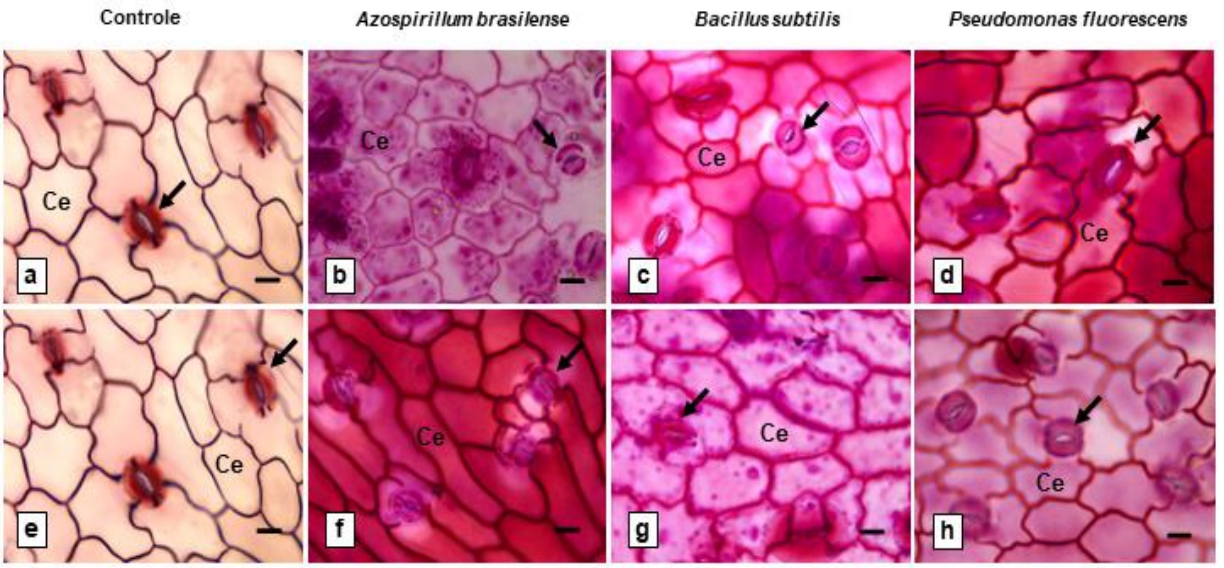

Figura 3. Vista frontal da superfície adaxial das folhas de *Calendula officinalis*., (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Células epidérmicas (Ce), estômatos (seta). Escala das barras: 20 µm.

Na superfície abaxial, as folhas de *Calendula officinalis* com *Azospirillum brasilense* inoculadas via semente apresentam células epidérmicas maiores quando

comparadas com as amostras inoculadas via foliar (Fig. 4b, f). Em contraposição, as folhas de *Calendula officinalis* inoculadas via foliar com *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* apresentaram células epidérmicas maiores quando comparadas com as amostras inoculadas via semente (Fig. 4c, g, d, h). Entre as bactérias, as células epidérmicas são maiores nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via foliar (Fig. 4g). A maioria dos estômatos são maiores em todas as amostras foliares com *Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente e via foliar (Fig. 4a-h).

Segundo Fanourakis *et al*., (2019) estômatos maiores possibilitam tanto a maior absorção de dióxido de carbono (CO_2) quanto o resfriamento foliar aprimorado através da perda de água que ocorre com a transpiração. Assim, os mesmos autores reconhecem isso como uma vantagem para o processo de trocas gasosas da planta quando o suprimento de água não é limitante. Isso condiz com o presente estudo na medida em que todas as plantas foram igualmente irrigadas tanto no começo do dia quanto no final da tarde.

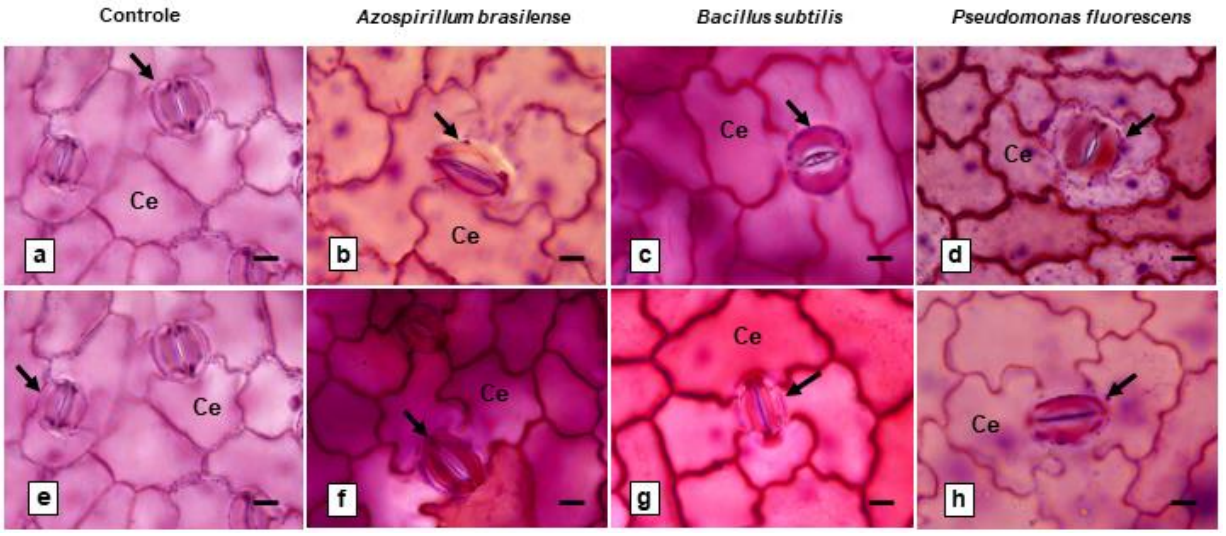

Figura 4. Vista frontal da superfície abaxial das folhas de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Células epidérmicas (Ce), estômatos (seta). Escala das barras: 20 µm.

Em secções transversais, as principais respostas anatômicas da lâmina foliar de *Calendula officinalis* são evidenciadas nos tecidos fotossintéticos que compõem o mesofilo (Fig. 5a-h). Nas amostras foliares do grupo controle, o parênquima paliçádico é alongado e possui três camadas de células bem desenvolvidas (Fig. 5a, e). Em

contraposição, nas amostras foliares com *Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* inoculados via semente e via foliar possui três camadas de parênquima paliçádico com células mais arredondadas do que alongadas (Fig. 5b-d, f-h), exceto as amostras foliares com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente que possui duas camadas de parênquima paliçádico (Fig. 5d).

Gotoh *et al*., (2018) explicam que o parênquima paliçádico mais arredondado ou esférico é geralmente encontrado em plantas cultivadas à sombra. Eles afirmam que quanto mais alongado for o parênquima paliçádico mais restrito fica o movimento dos cloroplastos e assim mais deles ficam alinhados às paredes independentemente das condições de luminosidade. Isso poderia facilitar a entrada de luz até as camadas mais profundas da célula ou a difusão de dióxido de carbono (CO_2), o que segundo eles contribuiria para uma performance superior em termos de fotossíntese por unidade de área foliar.

Segundo Prado (2020) o maior número de camadas torna o processo de fotossíntese mais eficiente ao aumentar a superfície interna da folha e a eficiência das trocas gasosas. Roberts *et al*., (2003) explicam que o número de camadas do parênquima paliçádico depende de diversos fatores. Folhas expostas a grande quantidade de luz e baixa humidade durante os primeiros estágios do desenvolvimento da planta terão parênquimas paliçádicos com várias camadas.

Nas amostras do grupo testemunha e naquelas com *Azospirillum brasilense* inoculadas via semente e foliar o parênquima lacunoso possui cinco camadas de células (Fig. 5a, b, e-f). Nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via semente observa-se sete camadas de parênquima lacunoso e seis nas amostras via foliar (Fig. 5c, g). Nas amostras com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente observa seis camadas de parênquima lacunoso e cinco via foliar (Fig. 5d-h). Ao comparar a lâmina foliar de todas as amostras com bactérias, é evidenciado que as amostras de *Calendula officinalis* com *Bacillus subtilis* inoculadas via semente são espessas e investem mais em camadas de parênquima lacunoso (Fig. 5c).

Esse resultado corrobora o estudo desenvolvido por Gashash *et al.* (2022), onde avaliaram o efeito da inoculação de *B. subtilis* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Os autores concluíram que as plantas inoculadas com a referida bactéria apresentam parênquima lacunoso significativamente maior do que os das plantas do grupo testemunha.

Em todas as amostras de *Calendula officinalis* inoculadas com bactérias foi observado nas células fotossintéticas vacúolos ricos em substâncias ergásticas (Fig. 5b-d, f-h). Essas substâncias são mais evidentes nas amostras com *Azospirillum brasilense* inoculadas via semente e via foliar (Fig. 5b, f), nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via foliar (Fig. 5g) e nas amostras com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente (Fig. 5d).

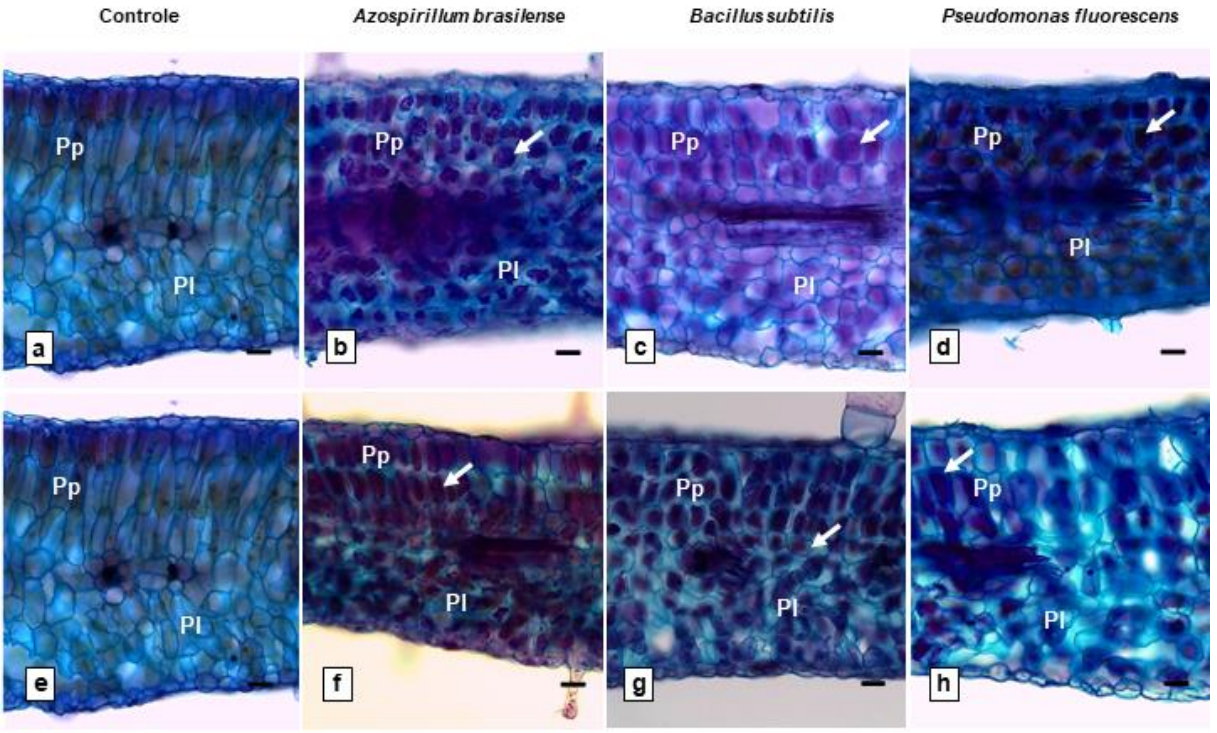

Figura 5. Secções transversais da lâmina foliar de *Calendula officinalis* ., (a-h). Controle (a, e). Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras foliares com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Parênquima paliçádico (Pp), parênquima lacunoso (Pl) e vacúolos com substâncias ergásticas (seta). Escala das barras: 35 µm.

Em secções transversais, a nervura central das amostras de *Calendula officinalis* do grupo controle apresentam formato plano-convexo (Fig. 6a, e). Nas amostras com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente e via foliar, a nervura central apresenta formato biconvexo (Fig. 6b, f, d, h). Em contraposição, nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via semente a nervura central apresenta o plano levemente convexo na superfície adaxial e convexo na abaxial (Fig. 6c). Nas amostras foliares inoculadas via foliar com *Bacillus subtilis* a nervura é plano-convexa (Fig. 6g). Ao comparar todas as amostras, foi evidenciado

que a nervura central é maior nas amostras com *Azospirillum brasilense* inoculadas via semente e via foliar (Fig. 6b, f).

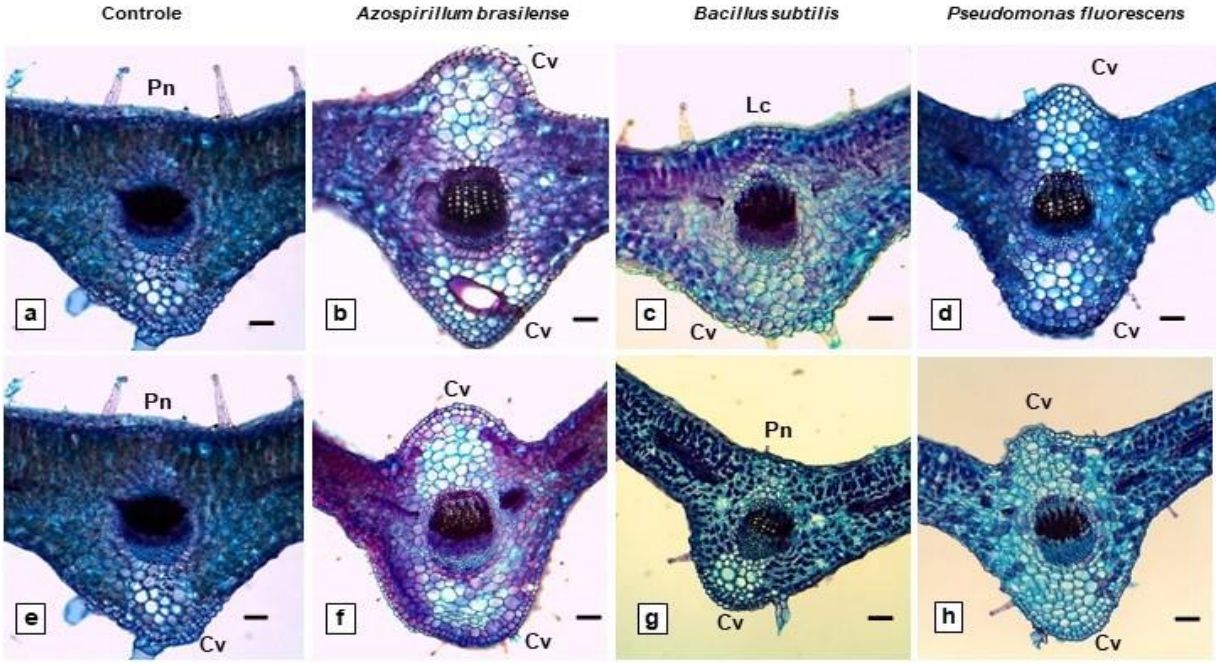

Figura 6. Secções transversais do aspecto geral da nervura central de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Amostras da nervura central com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Amostras da nervura central com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Plano (Pn), convexa (Cv) e levemente convexa (Lc). Escala das barras: 170 µm.

Na nervura central, o sistema vascular é maior nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via semente (Fig. 7c). Em contraposição, o sistema vascular é menor nas amostras inoculadas via semente e via foliar com *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 7d, h). Em todas as amostras com bactérias inoculadas via sementes, o xilema possui calibre semelhante ao grupo controle (Fig. 7a-d), no entanto nas amostras com *Pseudomonas fluorescens* a quantidade é reduzida (Fig. 7d).

Cai *et al*., (2017) ao analisarem as respostas das folhas da flor *Arabidopsis thaliana* à adição de nitrogênio afirmam que essa adição provoca aumento significativo no tamanho da nervura central. Segundo esses autores, isso poderia significar um aprimoramento da condutividade de água e minerais pela planta, o que de acordo com eles permitiria reduzir seus investimentos na estrutura do *xilema*. Isso condiz com o presente estudo na medida em que existem pesquisas publicadas que corroboram a capacidade das bactérias do gênero *Azospirillum* de fixar o nitrogênio atmosférico (BATABYAL, 2021).

Em contraste, nas amostras com bactérias inoculadas via foliar o calibre do xilema é menor quando associado ao grupo controle (Fig. 7e-h), no entanto nas amostras com *Azospirillum brasilense* a densidade de xilema é maior (Fig. 7f). Nas amostras com *Bacillus subtilis* inoculadas via semente a calota de floema é maior (Fig. 7c) e nas amostras com *Azospirillum brasilense* inoculadas via foliar (Fig. 7f). Apesar do sistema vascular ser pequeno nas amostras com *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 7d, h) é possível observar um investimento maior de floema nas amostras inoculadas via foliar (Fig. 7h).

Tang *et al*., (2022) explicam que embora as características do sistema de transporte de água (xilema) tenham sido utilizadas para prever o crescimento das plantas, a contribuição potencial do tecido de transporte de carbono (floema) permanece virtualmente inexplorado. Esses autores encontraram relações positivas entre a taxa de crescimento, diâmetro do floema e diâmetro do vaso do xilema. Para eles a associação entre as taxas de crescimento do caule e o tamanho do floema demonstra o valor potencial desta variável no processo de crescimento das plantas.

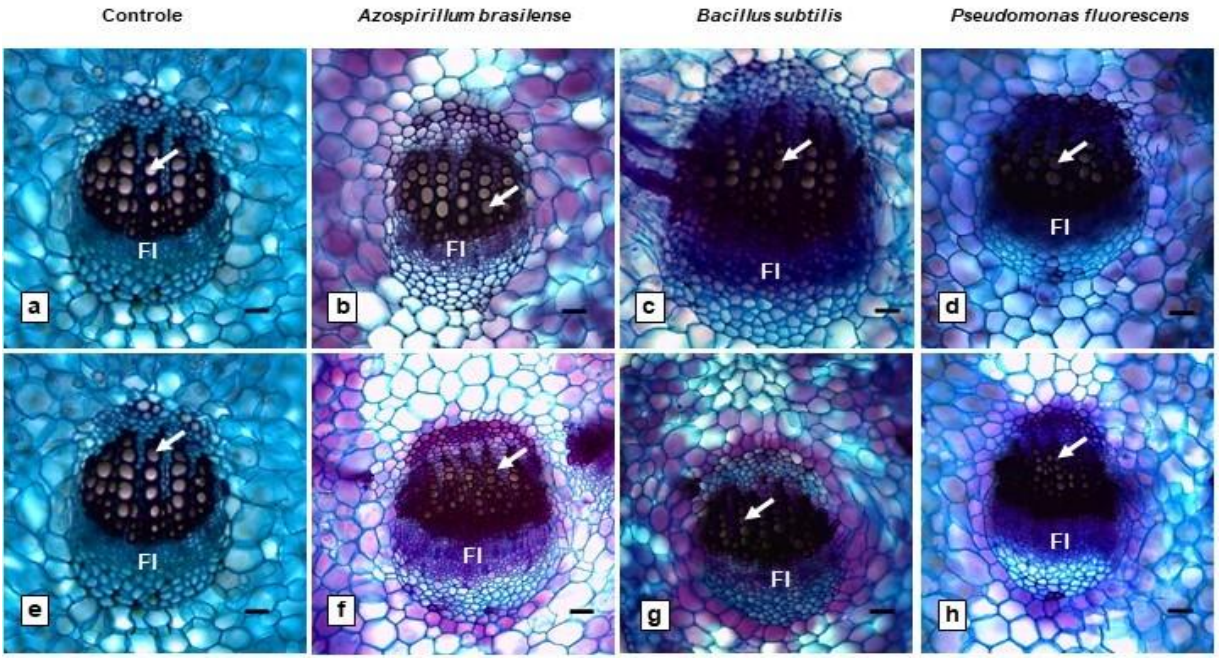

Figura 7. Secções transversais da nervura central ilustrando o sistema vascular de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Sistema vascular da nervura central com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Sistema vascular da nervura central com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Floema (Fl), xilema (seta). Escala das barras: 170 µm.

Em secções transversais, o caule da *Calendula officinalis* é maior nas amostras com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente e via foliar (Fig. 8d, h). Em contraposição, o menor caule é observado nas amostras de *Calendula officinalis* inoculadas via foliar com *Bacillus subtilis* (Fig. 8g). De todas as amostras, o maior caule é o de *Calendula officinalis* com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente (Fig. 8d). Neste caso, a morfologia do caule é distinta dos demais caules (Fig. 8a-h). No caule com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente, o seu formato é menos ornamentado (Fig. 8d) quando comparado com as demais amostras (Fig. 8a-c, e-h). As células parenquimáticas do córtex, os feixes e as células da medula são maiores (Fig. 8g).

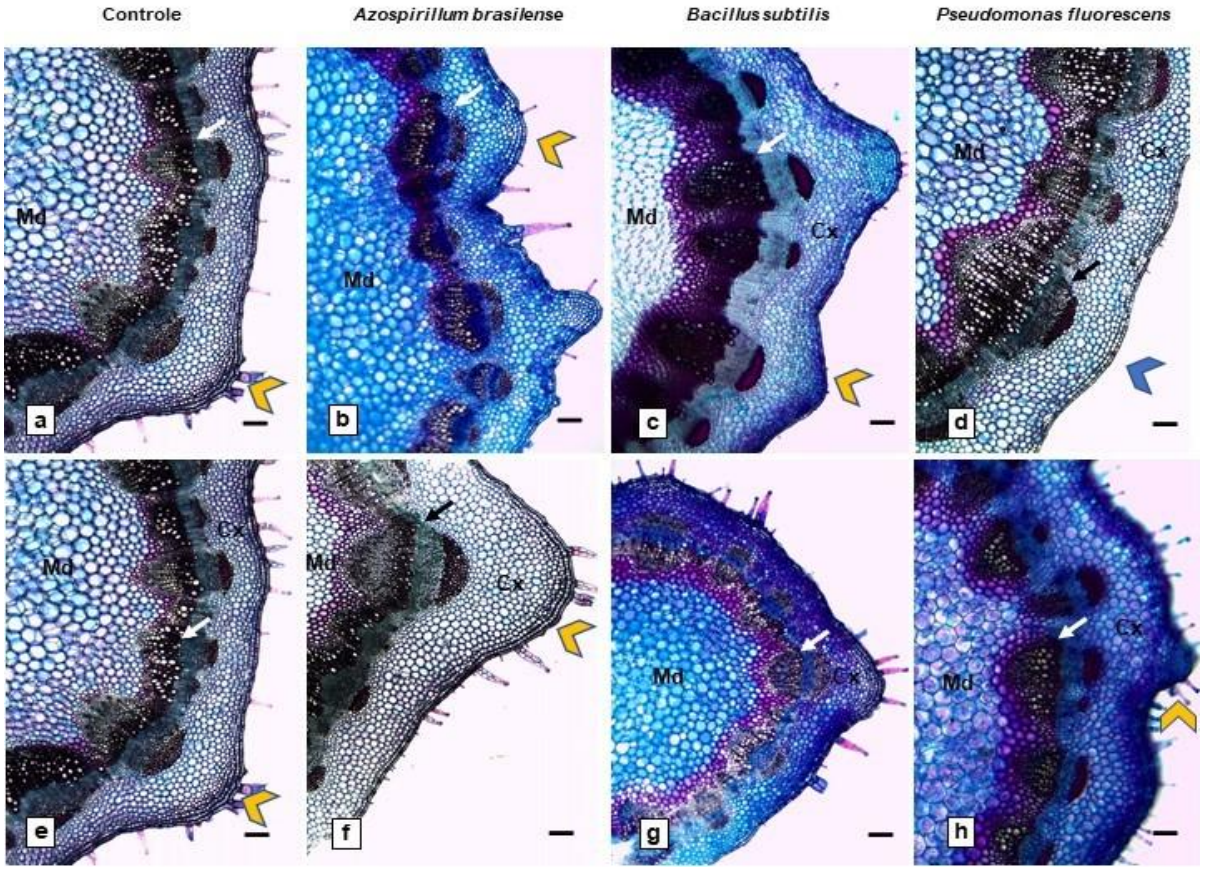

Figura 8. Secções transversais dos aspectos gerais do caule de *Calendula officinalis* ., (a-h). Controle (a, e). Aspecto geral do caule com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Aspecto geral do caule com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Medula (Md), córtex (Cx), sistema vascular (seta), caule com formato menos ornamentado (seta azul), caule com formato bem ornamentado (seta amarela). Escala das barras: 170 µm.

Em secções transversais, a raiz de *Calendula officinalis* é maior nas amostras com *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente (Fig. 9c, d) e a menor com *Azospirillum brasilense* (Fig. 9b). Nas amostras inoculadas via foliar a

maior raiz é observada com *Bacillus subtilis* (Fig. 9g) e a menor com *Azospirillum brasilense* (Fig. 9f). Entre as bactérias e os modos de aplicação, a raiz com *Pseudomonas fluorescens* inoculadas via semente é maior, principalmente o sistema vascular (Fig. 9d).

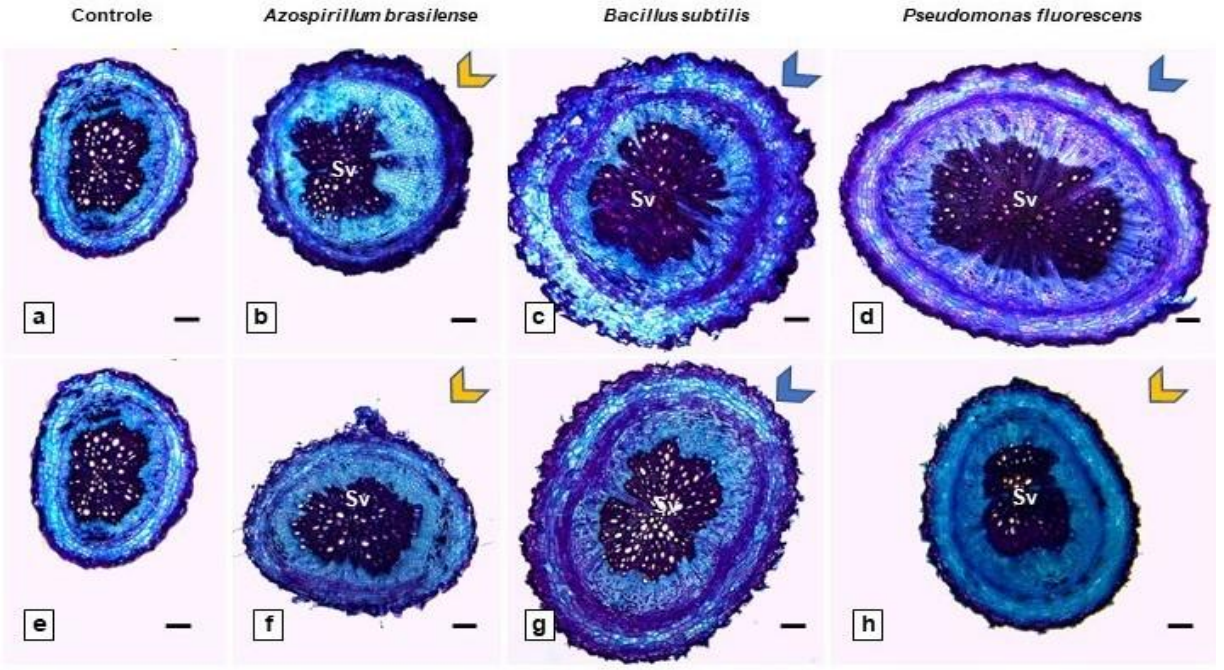

Figura 9. Secções transversais dos aspectos gerais da raiz de *Calendula officinalis*, (a-h). Controle (a, e). Aspecto geral da raiz com *Azospirillum brasilense* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Pseudomonas fluorescens* (d) inoculadas via semente. Aspecto geral da raiz com *Azospirillum brasilense* (f), *Bacillus subtilis* (g) e *Pseudomonas fluorescens* (h) inoculadas via foliar. Abreviações: Sistema vascular (Sv), maior raiz (seta azul), menor raiz (seta amarela). Escala das barras: 170 µm.

Esses resultados se assemelham aqueles obtidos por Cardoso *et al.* (2019) que analisaram o efeito da inoculação de *P. fluorescens* em mudas de plantas de alface. Esses autores observaram que as plantas inoculadas apresentaram alterações anatômicas com expressivo aumento tanto no tamanho da raiz quanto no tamanho do sistema vascular em relação às plantas não inoculadas.

Tabela 1. Caracteres anatômicos presentes na folha, caule e raiz de *Calendula officinalis*.

			Azospirillum brasilense	*Bacillus subtilis*	*Pseudomonas fluorescens*	*Azospirillum brasilense*	*Bacillus subtilis*	*Pseudomonas fluorescens*
		Forma de Inoculação	Via semente			Via foliar		
Dissociação - Vista Frontal	Epiderme adaxial	Células epidérmicas maiores			x	x	x	
		Células epidérmicas menores	x	x				x
		Estômatos maiores			x			
		Estômatos menores	x	x		x	x	x
	Epiderme abaxial	Células epidérmicas maiores	x				x	x
		Células epidérmicas menores		x	x	x		
		Estômatos maiores	x	x	x	x	x	x
Lâmina foliar – Vista Transversal	Mesofilo	Parênquima paliçádico com duas camadas			x			
		Parênquima paliçádico com três camadas	x	x		x	x	x
		Parênquima lacunoso com cinco camadas	x			x		x
		Parênquima lacunoso com seis camadas			x		x	
		Parênquima lacunoso com sete camadas		x				
Nervura central - Vista transversal	Formato	Biconvexo	x		x	x		x
		Levemente convexo adaxial e convexo abaxial		x				
		Plano convexo					x	
	Sistema Vascular	Sistema vascular maior		x				
		Sistema vascular menor	x		x	x	x	x
		Xilema com calibre semelhante ao controle	x	x				

		Xilema com calibre menor			x	x	x	x
Caule de Raiz - Vista Transversal	Caule	Maior caule			x			x
		Menor caule	x	x		x	x	
		Caule com formato bem ornamentado	x	x		x	x	
		Caule com formato menos ornamentado			x			x
		Córtex bem desenvolvido			x			x
		Córtex menos desenvolvido	x	x		x	x	
		Medula bem desenvolvida			x			x
	Raiz	Raiz maior		x	x		x	
		Raiz menor	x			x		x
		Maior sistema vascular		x	x		x	
		Menor sistema vascular	x			x		x

x – tamanho da estrutura

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a capacidade das rizobactérias analisadas em alterar a anatomia das plantas de calêndula. As principais respostas anatômicas foram observadas no tamanho das células epidérmicas, estômatos, formato e tamanho das células do parênquima paliçádico e lacunoso, quantidade de camadas de parênquima paliçádico e lacunoso, formato da nervura central, tamanho do sistema vascular, tamanho do caule, formato do caule, tamanho do córtex e da medula, tamanho da raiz e do sistema vascular. Observamos respostas de crescimento específicas de cada órgão vegetativo em função da ação de cada bactéria na *Calendula officinalis.*

Referências Bibliográficas

ABDELWAHAB, S. I.; TAHA, M.M.e.; TAHA, S.M.E.; ALSAYEGH, A.A. Fifty-year of global research in *Calendula officinalis* L. (1971−2021): a bibliometric study. **Clinical Complementary Medicine and Pharmacology**, 2:1-10, 2022.

ARORA, D.; RANI, A.; SHARMA, A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. **Pharmacognosy Network Worldwide**, 7:179-187, 2013.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2022. 422 p.

BATABYAL, B. Azospirillum: diversity, distribution, and biotechnology applications. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences,**12:17-25, 2021.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, 63:94-104, 2013.

CAI, Q.; JI, C.; YAN, Z.; JIANG, X.; FANG, J. Anatomical responses of leaf and stem of *Arabidopsis thaliana* to nitrogen and phosphorus addition. **Journal Of Plant Research**, 130:1035-1045, 2017.

CARDOSO, A.F.; RÊGO, M.C.F.; BATISTA, T.F.V.; VIANA, R.G.; LINS, A.L.F.A.; SILVA, G.B. Morphoanatomy and chlorophyll of lettuce plants induced by rhizobacteria. **Journal Of Agricultural Studies**, 7:196-211, 2019.

CHRISTENHUSZ, M.J.M.; FAY, M.F.; CHASE, M.W. **Plants of the World**: an illustrated encyclopedia of vascular plants. Chicago: University Of Chicago Press, 2017. 816 p.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J. G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, 62:188-197, 2011.

ESAU, K.; EVERT, R.F. **Anatomia das Plantas de Esau**. São Paulo: Blucher, 2013. 728 p.

FANOURAKIS, D.; HYLDGAARD, B.; GIDAY, H.; AULIK, I.; BOURANIS, D.; KÖRNER, O.; OTTOSEN, C.O. Stomatal anatomy and closing ability is affected by supplementary light intensity in rose (*Rosa hybrida* L.). **Horticultural Science**, 46:81-89, 2019.

GASHASH, E.A.; OSMAN, N.A.; ALSAHLI, A.A.; HEWAIT, H.M.; ASHMAWI, A.E.; ALSHALLASH, K.S.; EL-TAHER, A.M.; AZAB, E.S.; EL-RAOUF, H.S.A.; IBRAHIM, M.F.M. Effects of plant-growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) and cyanobacteria on botanical characteristics of tomato (*Solanum lycopersicon* L.) plants. **Plants**, 11:1-16, 2022.

GAZALA, Q.; ARA, S.; ANSARI, K.M.; MURTAZA, I.; QAZI, H.. Cytotoxicological evaluation of semi-purified extracts of some dye yielding plants of the Kashmir Valley on Normal Intestinal Cell Line (IEC-6) by MTT assay. **The Journal of Phytopharmacology**, 7:5-9, 2018.

GOTOH, E.; SUETSUGU, N.; HIGA, T.; MATSUSHITA, T.; TSUKAYA, H.; WADA, M. Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. **Nature**, 8;1-9, 2018.

JAN, N.; ANDRABI, K. I.; JOHN, R. *Calendula officinalis*: an important medicinal plant with potential biological properties. **Proceedings Of The Indian National Science Academy**, 83:769-787, 2017.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1st ed. McGraw-Hill Book, New York.1940a.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1940. 523 p.b.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2021. 576 p.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **The Annual Review of Microbiology**, 63:541-556, 2009.

PALAZZESI, L.; PELLICER, J.; BARREDA, V. D.; LOEUILLE, B.; MANDEL, J. R.; POKORNY, L.; SINISCALCHI, C. M.; TELLERÍA, M. C.; LEITCH, I. J.; HIDALGO, O. Asteraceae as a model system for evolutionary studies: from fossils to genomes. **Botanical Journal of the Linnean Society,** 200:143-164, 2022.

PRADO, R.M. **Nutrição de plantas**. 2. ed. São Paulo: Unesp Digital, 2020. 668 p.

QIN, S.; ZHANG, Y.J.; YUAN, B.; XU, P.y.; XING, K.; WANG, J.; JIANG, J.H. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant And Soil**, 374:753-766, 2014.

ROBERTS, A. V.; DEBENER, T.; GUDIN, S. (ed.). **Encyclopedia of Rose Science**. London: Elsevier, 2003. v. 1, 1200 p.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Fems Microbiology Letters**, 278:1-9, 2008.

SANTOS, M.P.; MARTÍNEZ, S.J.; YARTE, M.E.; CARLETTI, S.M.; LARRABURU, E.E. Effect of *Azospirillum brasilense* on the in vitro germination of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Schinn.(Gentianaceae). **Scientia Horticultura**, 299:1-7, 2022.

TANG, Y.; YIN, S.; PACE, M. R.; GEROLAMO, C. S.; NOGUEIRA, A.; ZUNTINI, A.R.; LOHMANN, L.G.; PLATH, M.; LIESCHE, J. Diameters of phloem sieve elements can predict stem growth rates of woody plants. **Tree Physiology**, 42:1560-1569. 2022.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J.G.; TONELLI, M.L.; LUDUENA, L.; PENA, D. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant And Soil**, 329:421-431, 2010.

WHO GLOBAL CENTRE FOR TRADITIONAL MEDICINE. **Catalysing ancient wisdom and modern science for the health of people and the planet**. Disponível em: https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine. Acesso em: 07 mar. 2023.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no primeiro e no segundo capítulo deste estudo corroboram a capacidade das rizobactérias *Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* tanto em promover o crescimento quanto em alterar a anatomia das plantas de calêndula. *Bacillus subtilis* destacou-se por fornecer a maior quantidade de massa fresca da flor, quantidade de flor e maior comprimento da raiz da calêndula. A combinação da inoculação nas sementes e aplicação via foliar maximizou a quantidade de massa fresca e massa seca da raiz da cultivar analisada. Em termos de alterações anatômicas, todas as bactérias foram capazes de provocar alterações nas plantas de calêndula. Sendo que todas as plantas inoculadas com quaisquer uma das rizobacterias citadas apresentaram estômatos maiores do que às das plantas do grupo controle. Como a inoculação com *Bacillus subtilis* se destacou no capítulo primeiro, é importante frisar que as plantas inoculadas com esta bactéria via foliar apresentaram tanto na superfície adaxial quanto na superfície abaxial a presença de células epidérmicas maiores do que as de plantas inoculadas com as demais rizobactérias e do que às do grupo testemunha. Os resultados obtidos no presente estudo chancelam o uso das rizobactérias como uma alternativa viável para aumentar o desempenho agronômico da calêndula (*Calendula officinalis*), considerando as diferentes formas de tratamento e doses aplicadas.

APÊNDICE

Universidade do Estado de Mato Grosso
Câmpus Universitário de Alta Floresta
Laboratório de Análises de Solo, Adubo e Foliar - LASAF

Proprietário: Fernanda da Cruz Propriedade: **Data:** 03/08/2022

Município: Laudo: 42_2022

Resultado das Análises

Amostra	Profundidade cm	pH Água	pH $CaCl_2$	P Mehlich mg/dm³	K mg/dm³	K cmol$_c$/dm³	Ca cmol$_c$/dm³	Mg cmol$_c$/dm³	Al cmol$_c$/dm³	H + Al cmol$_c$/dm³	Areia g/kg	Silte g/kg	Argila g/kg
01	-	5,7	5,3	127,0	1246	3,19	15,2	5,9	0,2	10,6	583	206	211

Amostra	Profundidade	CTC pH 7 T cmol$_c$/dm³	Soma de Bases SB cmol$_c$/dm³	Saturação por Bases V %	Saturação por Alumínio m %	Saturação por elemento K %	Saturação por elemento Ca %	Saturação por elemento Mg %	Relação Ca/Mg	Relação Ca/K	Relação Mg/K
01	-	34,8	24,2	69,5	0,7	9,2	43,5	16,8	2,6	4,7	1,8

NS = não solicitado
* Análise repetida e resultado confirmado
Amostra(s) coletada(s) pelo interessado
Metodologia, consulte **www.lasaf.unemat.com**







Rod. MT-208, km 147, Jardim Tropical, Alta Floresta – MT, CEP: 78580-000. Câmpus I – Universidade do Estado de Mato Grosso
Fone: (66) 3521-0204. Email: lasaf@unemat.br Site: www.lasaf.unemat.com