



FERNANDA MARCONDES DE ANDRADE

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO EM
MORANGUEIRO**

**LAVRAS – MG
2017**

FERNANDA MARCONDES DE ANDRADE

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E
INOCULAÇÃO EM MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Joyce Dória Rodrigues Soares
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan
Coorientadora

LAVRAS – MG

2017

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

Andrade, Fernanda Marcondes de.

Seleção de bactérias promotoras de crescimento e inoculação
em morangueiro / Fernanda Marcondes de Andrade. - 2017.

72 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues.

Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Bactérias promotoras de crescimento. 2. Inoculação. 3.
Morango. I. Rodrigues, Joyce Dória. II. Schwan, Rosane Freitas.
III. Título.

FERNANDA MARCONDES DE ANDRADE

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO
EM MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de julho de 2017

Prof.^a Dra. Ligiane Aparecida Florentino UNIFENAS

Prof.^a Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Prof.^a Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares UFLA

Prof.^a Joyce Dória Rodrigues Soares
Orientadora

Prof.^a Rosane Freitas Schwan
Co-Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

A Deus, a meus pais, Ana Maria e Márcio Fernando, a minha irmã Juliane e a meu namorado Marlon.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre comigo.

A meu pai, Márcio Fernando, por todo apoio, por sempre acreditar em mim e a minha mãe, Ana Maria, por suas orações, cuidados comigo, por todo amor incondicional e me apoiar sempre nas minhas decisões.

A minha irmã, Juliane, mesmo longe estava pronta para me ajudar, obrigada pelo carinho. A meu querido namorado, Marlon, companheiro, por todo amor, não mediu esforços e me ajudou em tudo que podia fazer, obrigada por acreditar em mim quando já estava quase desistindo.

A Prof.^a Dr.^a Joyce Dória Rodrigues Soares pela orientação, oportunidade de termos desenvolvido esse trabalho, pelas sugestões apresentadas, por todo conhecimento.

A Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan pela coorientação, paciência, confiança, todo conhecimento e por fazer parte da minha banca de defesa.

A Prof.^a Dr.^a Ligiane Aparecida Florentino pela oportunidade de participar da minha banca de qualificação e da defesa, por toda atenção e paciência, por tirar dúvidas do trabalho, por todas as sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Sales Guimarães pela ajuda na parte estatística do trabalho, por toda atenção e paciência.

Ao pós-doutorando Thiago, meu “braço direito”, me ajudou em todos os momentos que precisava. Obrigada pela oportunidade de termos trabalhado juntos, por ter aceitado esse grande desafio que foi, por todo conhecimento, paciência e pela amizade.

Aos pós-doutorandos Suzana, Beatriz, Maria Gabriela, Angélica, Leonardo e Cleber por toda ajuda, paciência, pelas sugestões apresentadas.

Meus grandes amigos de longa data, minha pequena família de Lavras: Carol, Tati e Alex (obrigada por me acolher em Lavras quando já não tinha mais lugar para ficar junto com a Ju e a pequena Tequila), pela amizade que nos unirá sempre.

A todos os mestrandos, doutorandos dos Laboratórios de Fermentações, Microbiologia Ambiental e Industrial e Biogen pela boa convivência, aos meus amigos queridos do Laboratório de Cogumelos Tati, Cibelli, Jéssica, Lídia, Aline, Lívia, Carol Collela, obrigada pela boa convivência e risadas e pela amizade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos na Agricultura, aos técnicos Vantuil e Claret, ao pós-doutorando Filipe (Batata) pela atenção e ao doutorando Neilton também pela ajuda

estatística. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), às técnicas Aline, Elisa e ao Prof. Eduardo pela atenção e paciência.

Ao estagiário Thiago por toda ajuda (que não foi pouca!), pela amizade e paciência comigo. As estagiárias Vanessa e Carla pela ajuda de sempre no laboratório e as estagiárias Iara e Viviane por ajudar a cuidar dos meus morangos.

Aos técnicos, Paulinho (por todas as vezes que me deixou usar a autoclave grande, e pelo carinho que sempre teve comigo desde quando era estagiária), Cidinha pela atenção, cuidados que sempre tem com todos os alunos e Ivani por toda paciência e boa convivência.

A minha turma de mestrado Ana Paula, Silvia, Marília, Dérica, Rafa loira, Rafa morena, Michelli, Daiane, Natanne, Orlando e Aline (doutorado) pela convivência, boas risadas e trabalhos em grupo.

A secretária Rose do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela paciência e profissionalismo exemplar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o período do mestrado.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) por toda formação e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida da realização desse mestrado

Por todas as pessoas que ajudaram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

"Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza - e também nos torna mais conscientes da nossa responsabilidade é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios daqueles que se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que nós cremos". (Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 2.1 – Produção em toneladas de morango pelo Brasil dos anos 1985 a 2014..... 17

SEGUNDA PARTE

Figura 2.1 – Inoculação nas raízes do morango e medições com paquímetro.....42

Figura 3.1 – Teste de fixação de nitrogênio em meio NFB (A) e JMV (B) 49

Figura 3.2 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango (Comprimento da Parte
Aérea e Raiz) 50

Figura 3.3 – Imagens dos tratamentos após 75 dias de avaliação do experimento..... 52

Figura 3.4 – Diâmetro médio das plantas ao longo do tempo de inoculação (Bactéria x
Tempo)..... 56

Figura 3.5 – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura das raízes do
morango inoculado e não inoculado 58

Figura 3.6 – Distribuição percentual de bactérias endofíticas identificadas..... 62

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 2.1 – Principais produtores de morango do mundo comparados com o Brasil.....	16
Tabela 2.2 – Maiores rendimentos de produção de morangos comparados com o Brasil.....	16

SEGUNDA PARTE

Tabela 2.1 – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento.....	37
Tabela 2.2 – Tratamentos usados no experimento.....	41
Tabela 3.1 – Testes de Produção de Auxina e Fixação de nitrogênio das estirpes (CCMA-UFLA)	47
Tabela 3.2 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango	54
Tabela 3.3 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango	55
Tabela 3.4 – Identificação das bactérias isoladas das raízes e folhas do morango.....	59

SUMÁRIO

I PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Aspectos gerais sobre a cultura do morango	14
2.2	Produção mundial e nacional de morango	15
2.3	Bactérias promotoras de crescimento em plantas	17
2.4	Mecanismos de promoção de crescimento vegetal	20
2.5	Fixação biológica de nitrogênio	21
2.6	Produção de fitormônios	22
	REFERÊNCIAS	25

II ARTIGO

	SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO EM MORANGUEIRO	32
1	INTRODUÇÃO	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Estirpes utilizadas.....	36
2.2	Fixação biológica de nitrogênio	36
2.3	Produção do fitohormônio vegetal - auxina (ácido-3-indolacético)	39
2.4	Experimento, delineamento e tratamentos.....	39
2.5	Bactérias, preparo do inoculante e avaliações do crescimento.....	41
2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
2.7	Isolamento das bactérias endofíticas das folhas, caules e raízes do morango pós- inoculação	44
2.8	Análise proteica das células bacterianas	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Seleção das bactérias	47
3.2	Avaliações do crescimento do morango.....	49
3.3	Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ...	57
3.4	Isolamento das bactérias endofíticas	59
4	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS	65

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A demanda de tecnologias e alternativas para melhorar a produção agrícola de forma sustentável tornou-se primordial nos últimos anos, principalmente a dependência de fertilizantes usados na produção de alimentos (OLIVEIRA et al., 2014). Os métodos de cultivo de plantas visam atingir o máximo potencial de produção agrícola. Para isso, tais métodos requerem, dentre outros insumos, a aplicação de grande quantidade de fertilizantes e agrotóxicos, o que, por consequência, causam problemas à saúde humana e um desequilíbrio nos agroecossistemas, causando, em especial, dano às comunidades que habitam o solo, como os microrganismos (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015).

Pesquisas têm demonstrado que bactérias possuem uma íntima interação com as plantas e são capazes de promover o seu crescimento, além de protegê-las contra patógenos e parasitas, promovendo maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico (WHIPPS, 2001; FIGUEIREDO et al., 2010; BULGARELLI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Dentro desse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) é uma alternativa viável na diminuição de custos com insumos agrícolas e no consequente aumento da produtividade (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; GLICK, 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Estudos têm demonstrado aumento significativo na germinação, rendimento de grãos, redução de doenças e melhoria do crescimento da planta em culturas como soja, feijão, algodão, milho, arroz, tomate, morango entre outras (ASSUMPÇÃO et al., 2009; HUNGRIA, 2011; PEREIRA et al., 2012; OSÓRIO FILHO et al., 2014; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2015), tornando o produto diferenciado e, consequentemente, elevando sua competitividade no mercado com custos reduzidos para o produtor.

Cresce dentre a população a procura de alimentos mais saudáveis que ofereçam conveniência, praticidade e alta qualidade. Por esse motivo, a procura por frutas e hortaliças vem crescendo constantemente (ASSIS; UCHIDA, 2014). Dentre os alimentos benéficos à saúde, o morango (*Fragaria ananassa*, Duch.) é uma das culturas cuja importância econômica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, sendo uma fonte de renda para grandes e pequenos produtores (PONCE et al., 2010). Os frutos de morango são muito apreciados pelos valores nutricionais e medicinais, mas o excesso de produtos químicos para o controle de patógenos prejudica a cultura em relação ao consumo destes frutos (GIAMPIERI et al., 2012).

Sendo assim, faz-se necessário conhecer o potencial destas bactérias em relação ao morango. Portanto, o objetivo deste estudo foi uma triagem das bactérias pertencentes à Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA-UFLA), em relação ao potencial de promoção de crescimento por meio dos testes de fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético. Após isso, selecionar as três melhores bactérias a partir dos resultados desses testes e, inocular em mudas de morangueiro da cultivar *Aromas*, em estufas e avaliar o crescimento dessas plantas. Foi também realizado o isolamento dos microrganismos endofíticos das plantas inoculadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais sobre a cultura do morango

O morangueiro é uma planta pertencente à família *Rosaceae*, sendo resultante do cruzamento entre as espécies nativas *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, formando a espécie botânica (*Fragaria ananassa*, Duch.) (SANTOS; MEDEIROS, 2003; FILGUEIRA, 2013). É uma das mais apreciadas frutas no mundo devido às suas propriedades organolépticas, tais como sabor, coloração, aroma e benefícios para a saúde (BOMBARELY et al., 2010; KURAS; KORBIN, 2010).

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), as características nutricionais do morango são 91,5% de água, 6,8 g de carboidratos, 0,9 g de proteínas, 1,7 g de fibras, 11 mg de cálcio e 10 mg de magnésio e média de 30 calorias em 100 g de frutas, além de vitaminas A, B e C e outros elementos como fósforo, ferro, potássio, cobre e zinco. Alguns compostos fenólicos também foram identificados em morangos, sendo que existe um interesse muito particular em relação ao ácido elágico, também possui propriedades antioxidantes, alto teor de vitamina C e ajuda na prevenção e combate a determinadas doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer entre outras (VIZZOTTO, 2012). Além disso, os morangos são economicamente importantes e amplamente consumidos frescos ou em formas processadas, tais como compotas, sucos e geleias. É por isso que eles estão entre as frutas mais estudadas da agricultura, no âmbito genômico e nutricional (GIAMPIERI et al., 2012).

O morango é uma planta nativa das regiões de clima temperado da Europa, Mediterrâneo e das Américas (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011), mas adaptou-se a diferentes condições climáticas, sendo cultivado em todo o mundo (SILVA; DIAS; MARO, 2007). Os países com maior produção, segundo a FAO (2014), são Estados Unidos, China, Espanha, Turquia, México, Itália, Japão, e Polônia.

Segundo Filgueira (2013), o morangueiro é considerado uma pequena planta herbácea e estolonífera, rasteira, perene, cultivada como anual, sendo o sistema radicular fasciculado e muito superficial, com a maior parte das raízes nos primeiros cinco centímetros do solo. As raízes primárias são as que se desenvolvem a partir da coroa, são perenes e a sua função principal é a reserva de carboidratos. As raízes fasciculadas ou secundárias se originam a partir das adventícias e são as responsáveis pela absorção de água e nutrientes;

estas têm vida curta (de dias a semanas) quando são substituídas rapidamente por outras que surgem acima das velhas (BUCCI; FAEDI; BARUZZI, 2010).

As folhas do morangueiro podem ser constituídas de três a cinco folíolos e as flores são agrupadas em florescência do tipo ciméria, com cálice, na maioria das vezes, pentâmero. O processo de florescimento é extremamente dependente de fatores ambientais e o processo de polinização ocorre por intervenção de insetos e pelo vento (SILVA; DIAS; MARO, 2007). A parte comestível é constituída por um receptáculo carnoso e suculento, de coloração vermelha, considerado pseudofruto, já que os frutos verdadeiros são os arquênios, que são estruturas escuras e pequenas que contêm as sementes e se prendem ao receptáculo (FILGUEIRA, 2013). O fruto é classificado como não climatérico e deve ser colhido no ponto de maturação, quando tiver 75% da epiderme vermelha (ANTUNES et al., 2006).

As diferentes espécies de morango, gênero *Fragaria* são classificadas de acordo com a resposta ou sensibilidade ao fotoperíodo em cultivares de dia curto (DC), dia longo (DL) ou dia neutro (DN). A grande maioria das cultivares modernas de morangueiro *Fragaria ananassa* Duch. são cultivares de dias curtos ou cultivares de dias neutros (HANCOCK et al., 2004). As principais cultivares utilizadas no Brasil provém dos Estados Unidos, destacando-se Aromas, Camarosa, Oso Grande, Camino Real, Diamante, Dover, Sweet Charlie e Ventana (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005).

2.2 Produção mundial e nacional de morango

Segundo dados mais recentes da FAO (2014), a produção mundial de morangos em 2014 foi de aproximadamente 8.114.373 de milhões de toneladas, utilizando-se para isso uma área cultivada superior a 243 mil hectares, com produtividade média de mais de 18,8 t ha⁻¹. Essa produção mundial é dominada por um grupo de 13 países com produções acima das 100.000 toneladas anuais. Juntos representam quase 85% do total da produção de morangos, destacando EUA, China, Espanha, Turquia, Egito, México, Rússia, Japão entre outros.

De acordo com a Tabela 2.1, os países que mais produzem morango são a China, com uma produção de mais de 3 milhões de toneladas em uma área de 113300 hectares; os Estados Unidos, com mais de 1 milhão de toneladas, em uma área de 24239 hectares; e o México, com mais de 400 mil toneladas, em uma área de 9966 hectares. Já os países com maior produtividade, de acordo com a Tabela 2.2, são os Estados Unidos, com 56,5854 t ha⁻¹, seguido por México, com 46,0538 t ha⁻¹, e Egito, com 43,5506 t ha⁻¹.

Tabela 2.1 – Principais produtores de morango do mundo comparados com o Brasil

Posição	País	Produção (t)
1	China	3113000
2	Estados Unidos	1371573
3	México	458972
4	Turquia	376070
5	Espanha	291870
6	Egito	283471
59	Brasil	3257

Fonte: (FAO, 2014)

Tabela 2.2 – Maiores rendimentos de produção de morango comparados com o Brasil

Posição	País	Rendimento (t/ha)
1	Estados Unidos	56,5854
2	México	46,0538
3	Egito	43,5506
4	Kuwait	43,5000
5	Israel	40,0282
6	Marrocos	39,8804
49	Brasil	8,4485

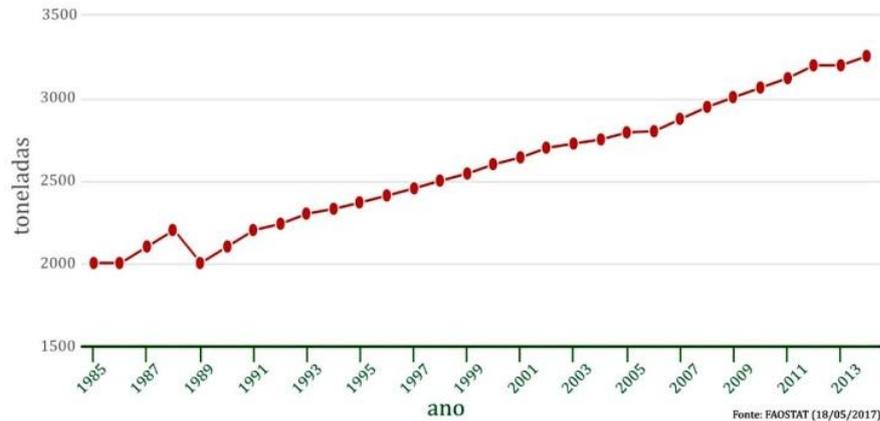
Fonte: (FAO, 2014)

Segundo as Tabelas 2.1 e 2.2, o Brasil ainda não se encontra entre os grandes produtores mundiais, mas começa a se destacar, devido às condições ambientais favoráveis para o cultivo e pela produção em quase todos os meses do ano (SANTOS; MEDEIROS, 2003; FAO, 2014). Segundo a Figura 2.1, a produção brasileira de morango em 2014 foi de mais de 3 mil toneladas em uma área de 386 hectares, com uma produtividade média de 8,4485 t ha⁻¹ (FAO, 2014).

No Brasil, a cultura do morangueiro tem se concentrado em regiões serranas típicas de clima temperado e próximas de grandes centros metropolitanos por questões de logística e comercialização (ALMEIDA et al., 2009). Os Estados de maior produção são Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo, com produção em crescimento em outros Estados, tais como Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Goiás e Distrito Federal (RONQUE, 1998; ANTUNES; PERES, 2013). O Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, com cerca de 40 mil toneladas/ano, o equivalente a 40% da produção nacional (ANTUNES et al., 2010). É produzido na maioria dos municípios do extremo sul, na região da Mantiqueira, sendo Pouso Alegre e Estiva os maiores produtores, e nos Campos das Vertentes, em Barbacena e municípios vizinhos (FILGUEIRA, 2013). Dentre os principais fatores que

proporcionaram esse destaque, estão as condições climáticas favoráveis para o cultivo e a localização estratégica, próxima aos grandes centros consumidores (VEIGA JUNIOR, 2006).

Figura 2.1 – Produção em toneladas de morango pelo Brasil dos anos 1985 a 2014



Fonte: (FAO, 2014)

Em Minas Gerais as cultivares mais plantadas são Oso Grande (DC) e Camarosa (DC), no Rio Grande do Sul, Camarosa (DC) e Albion (DN) representam o 90% da produção, seguidas por San Andreas (DN), Monterrey (DN) e Portola (DN). Nos Estados de Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo, as principais cultivares plantadas são: Camarosa (DC), Oso Grande (DC), Aromas (DN), Albion (DN) e Diamante (DN) (LÓPEZ-ARANDA et al., 2011; FAGHERAZZI et al., 2014). O mercado nacional de cultivares está dividido da seguinte maneira, em porcentagem de plantio: Oso Grande (50%), Camarosa (30%), Albion (6%) e Aromas (4%) (ANTUNES; PERES, 2013). Os 10% restantes ficam com Sweet Charlie, Tudla, Camino Real, Ventana, Toyonoka, Portola, Flórida Festival, Flórida Fortuna, San Andreas, Monterey, Diamante, Dover e outras.

2.3 Bactérias promotoras de crescimento em plantas

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos, que são bactérias associativas devido às interações com a planta hospedeira (PEREIRA et al., 2012) que modulam o metabolismo da planta e estimulam seu crescimento e produtividade por efeitos diretos e/ou indiretos (OLIVEIRA et al., 2014). Essas bactérias fazem parte da população residente das plantas como epifíticas, ou endofíticas, e não são fitopatogênicas (ANDREOTE et al., 2009).

Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes, mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós colheita (FIGUEIREDO et al., 2010). Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são: aumento da taxa de germinação, rendimento de grãos, no comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, aumento do número de flores entre outros. Podem também atuar como biocontroladoras no crescimento, infectividade, virulência e agressividade do patógeno (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

No campo, o uso dessas bactérias tem observado uma proteção contra doenças e aumento de produtividade, já que os efeitos são, principalmente, aumento de área foliar, diâmetro de pseudocaule, número de folhas e matéria seca, com conseqüente redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante (FALEIRO; ANDRADE; REIS, 2011). Inoculantes comerciais contendo BPCP pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Bacillus* já foram lançados no mercado mundial para o uso da comunidade agrícola, com potencial fertilizante, controle de doenças vegetais e gerenciamento de pragas, tais como, Diegall, Galltrol-A, Zea-Nit, Azo-Green, Epic, Quantum 4000, Victus, Mycostop entre outros (BHATTACHARYYA; JHA, 2011). Entre as principais BPCPs empregadas em pesquisas estão espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* (OLIVEIRA et al., 2014; GIRIO et al., 2015).

As bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as mais abundantes na rizosfera e sua atividade como promotora de crescimento vegetal vem sendo muito estudada, objetivando-se estimular mecanismos desejáveis aos cultivos como a nodulação de leguminosas, fixação biológica de nitrogênio (N) e absorção de nutrientes (SAHARAN; NEHRA, 2011). Algumas espécies estão sendo utilizadas para insumo na agricultura como *Bacillus fimus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* (GLICK, 2012). Rocha e Moura (2013) verificaram efeitos positivos no controle da doença murcha de fusário em tomate mediante o uso de *Bacillus* spp., sendo o uso dessas rizobactérias uma alternativa para o manejo de patógenos habitantes do solo, considerados de difícil controle.

Já o gênero *Azospirillum* são produtoras de AIA mais conhecidas e estudadas (DOBBELAERE et al., 1999) e estão sendo usadas como biofertilizante em vários países do mundo. É uma bactéria do solo capaz de viver em condições associativa nas raízes de várias

plantas, incluindo grãos (HUNGRIA, 2011; HOSSAIN et al., 2015). Promove o crescimento da planta, fixando o nitrogênio atmosférico e por outras formas, como a produção de substâncias promotoras do crescimento e influenciando o desenvolvimento da raiz, aumentando a absorção de nutrientes do solo terra e inibindo fungos patogênicos e bactérias na rizosfera (KANNAN; PONMURUGAN, 2010).

O gênero *Burkholderia* é considerado agente patogênico oportunista que causam infecções respiratórias graves entre pessoas que sofrem de fibrose cística (FC) ou indivíduos imunocomprometidos (COENYE, VANDAMME, 2003; VANLAERE et al., 2008). Entretanto, várias cepas desenvolveram interações benéficas com seus hospedeiros de plantas e provaram ser agentes altamente eficientes de biocontrole, biorremediação ou promoção do crescimento de plantas. Diversas pesquisas estão sendo realizadas sobre esse gênero mostrando ter resultados promissores no crescimento e desenvolvimento das plantas (LOVAISA et al, 2015; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al, 2016).

As bactérias do gênero *Enterobacter*, podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes. Tem adquirido importância por possuir representantes capazes de fixar nitrogênio, produção de fitohormônios como etileno e auxina, atuando no crescimento e alongamento das raízes proliferação dos pêlos radiculares, sendo encontrados em muitas espécies vegetais, tanto endofíticas quanto na rizosfera (SANTI FERRARA et al., 2012; RAMESH et al, 2014).

Pesquisas mostraram que a bactéria *Azospirillum brasilense*, isolada de raízes de morangueiro, mostrou ter efeitos benéficos como fixação de N, auxina e produção de sideróforo, além de apresentar quimiotaxia positiva em relação ao exsudato de raízes de morangueiro, atividade de biocontrole contra a doença da antracnose, colonização de diferentes tecidos de morango e efeitos de promoção do crescimento em plantas de morangueiro em condições controladas e de campo (PEDRAZA et al., 2009; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012). Ainda em relação à cultura do morangueiro, foi relatado o uso de diferentes microrganismos benéficos, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Azospirillum*, indicando que eles foram capazes de aumentar a biomassa vegetal e o rendimento de frutos (ESITKEN et al., 2010; ERTURK; ERCISLI; CAKMAKCI, 2012; SALAZAR et al., 2012). Pereira et al (2012) encontrou alguns gêneros de bactérias endofíticas no fruto do morango com possível potencial promotor de crescimento, tais como *Bacillus subtilis*, *Curtobacterium citreum*, *Pantoea punctata*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter ludwigii*, *Pseudomonas* sp. entre outras.

Outras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de conhecer cada vez as potencialidades das BPCPs e tem tido sucesso na medida em que já existem produtos comerciais à base dessas bactérias em vários países como Estados Unidos, Austrália e China, pois aumentam a produtividade (FIGUEIREDO et al., 2010). Assim, a interação entre planta e microrganismos promotores do crescimento vegetal pode contribuir para o crescimento, saúde e desenvolvimento da planta (BERG, 2009).

2.4 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal

Bactérias possuem a capacidade de colonizar a superfície de raízes, bem como os tecidos vegetais internos, modulando o metabolismo da planta e estimulando seu crescimento e produtividade por efeitos diretos e/ou indiretos (OLIVEIRA et al., 2014). O efeito promotor dessas bactérias é, em grande parte, explicado pela liberação de metabolitos que estimulam diretamente o crescimento vegetal (ESITKEN et al., 2010).

Dentre os mecanismos de promoção de crescimento indiretos, destacam-se o controle biológico por competição de nutrientes e produção de sideróforos, que são pequenos compostos quelantes de ferro de alta afinidade secretados por plantas e microrganismos. O ferro (Fe) é essencial para o crescimento celular e metabolismo, de tal forma que a aquisição de Fe através da produção de sideróforos desempenha um papel essencial na determinação da aptidão competitiva das bactérias para colonizar as raízes das plantas e competir pelo ferro com outros microrganismos na rizosfera. A produção de BPCP pelo sideróforo pode prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos por sequestro de Fe^{+3} na área em torno da raiz (KUMAR et al., 2015); antibiose; atividade antifúngica um dos mecanismos de biocontrole mais poderosos e estudados das bactérias promotoras do crescimento das plantas contra os fitopatógenos (SHILEV, 2013). Também como mecanismos indiretos à resistência sistêmica induzida, que é definida como um estado fisiológico de capacidade defensiva, em resposta a estímulos ambientais específicos e, conseqüentemente, as defesas inatas da planta são potencializadas contra desafios bióticos subsequentes como patógenos de origem fúngica ou viral, além de insetos e nematoides (AVIS et al., 2008; NAZNIN et al., 2013).

Já os mecanismos diretos de promoção de crescimentos são a produção de ácido cianídrico, que aumenta o desenvolvimento de pelos radiculares; a produção de hormônios vegetais como auxinas, etileno, giberelinas e citocininas; liberação de enzimas como a ACC deamiase, que promove o desenvolvimento precoce de raízes e proteção contra estresse ambiental, solubilização de fosfato, que desempenha um papel importante em praticamente

todos os principais processos metabólicos nas plantas, incluindo fotossíntese, transferência de energia, biossíntese macromoléculas e respiração (KHAN et al., 2010), solubilização de fosfato (KUMAR; DUBEY, 2012), fixação biológica de nitrogênio atmosférico; produção de vitaminas, aminoácidos, poliaminas e outras substâncias (CASTILLO et al., 2015; PRASAD; KUMAR; VARMA, 2015; SIVASAKTHI; USHARANI; SARANRAJ, 2014).

2.5 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para os organismos vivos e, juntamente com carbono e hidrogênio, participam na composição das moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, clorofila entre outras. Faz parte integrante das proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas essenciais para as reações bioquímicas em plantas e microrganismos, isso o torna um dos elementos absorvidos em maiores quantidades pelas plantas (KUMAR et al., 2015).

Entretanto, na natureza, mais de 80% do nitrogênio está presente na atmosfera e não está disponível para as plantas (KUMAR et al., 2015). Apesar da abundância de nitrogênio na atmosfera terrestre, os organismos eucariotos não conseguem utilizar este elemento diretamente, apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera. Este processo chamado fixação biológica do nitrogênio (NFB) consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em amônia e a reação é catalizada pela enzima nitrogenase (TAIZ; ZEIGER, 2012).

Diversos grupos de bactérias são responsáveis pela fixação do nitrogênio nas plantas, esses microrganismos são conhecidos como diazotróficos. O modo de vida desses seres pode ser vida livre ou associados a diversas espécies vegetais. A contribuição das bactérias diazotróficas não se limita ao provimento de nitrogênio à planta, sendo que está presente na síntese de fitormônios, antagonismo a fitopatógenos, solubilização de fosfatos, entre outras funções. Com isso, a preservação da biodiversidade dessas bactérias se torna vital para um bom equilíbrio do sistema agrícola. (MOREIRA et al., 2010). Segundo Monteiro et al. (2012), as bactérias fixadoras de nitrogênio têm a capacidade de produzir polissacarídeos. Esses polissacarídeos são muito importantes para que ocorra a simbiose com a planta.

Certas bactérias promovem o crescimento das plantas e têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo às plantas por dois mecanismos: simbióticos e não-simbióticos. A fixação simbiótica de nitrogênio é uma relação mutualística entre um microrganismo e a planta, que este entra primeiro na raiz e, depois, forma nódulos nos quais

ocorre a fixação de nitrogênio. *Rhizobia* é um vasto grupo de rizobactérias que têm a capacidade de estabelecer interações simbióticas pela colonização e formação de nódulos radiculares com leguminosas, onde o nitrogênio é fixado à amônia, e torná-lo disponível para a planta (AHEMAD; KIBRET, 2014). Por outro lado, a fixação não-simbiótica do nitrogênio, cujos microrganismos são chamados de diazotróficos de vida livre, pode estimular plantas não-leguminosas. A fixação de nitrogênio não-simbiótica ocorre por bactérias rizosféricas pertencentes a gêneros: *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*) (BHATTACHARYYA; JHA, 2011; VESSEY, 2003).

O custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é elevado e resulta na necessidade de gasto energético não renovável (OLIVEIRA et al., 2014). Com o emprego das bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura é possível economizar milhões em dólares de petróleo e gás natural, utilizadas para síntese de amônia, simultaneamente contribuir para aumentos de produtividade (BOTTA et al., 2013) e diminuir a poluição de rios e lagos.

2.6 Produção de fitormônios

Fitormônios desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento de plantas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2013). De acordo com classificação convencional, existem cinco grupos de fitormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2007; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2013). Entretanto, outros hormônios foram descobertos posteriormente, como estrigolactonas, brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico, poliaminas e óxido nítrico (SPAEPEN, 2015).

Pesquisas com as bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, produzem fitormônios como o ácido indol acético, ácido indol butírico, giberelinas, citocininas, octadecanóides, e compostos que imitam a ação dos jasmonatos (FORCHETTI et al., 2007; KANG et al., 2008; PÉREZ GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011). Muitas bactérias endofíticas produzem esses hormônios, que podem auxiliar na sobrevivência da planta, principalmente em espécies que crescem sob condições restritas, como seca, salinidade, (FORCHETTI et al., 2007), ajuste osmótico, controle da abertura e fechamento estomático, modificação da morfologia radicular, eficiência fotossintética, aumento da captação e alteração do acúmulo de minerais, suprimento de

vitaminas essenciais e metabolismo do nitrogênio (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; FIGUEIREDO et al., 2007).

Dentre os fitormônios citados, a auxina (ácido indol-3-acético ou AIA) é a mais estudada, e importante para crescimento das plantas, sendo a capacidade de síntese deste fitormônio amplamente distribuída entre bactérias associativas (OLIVEIRA et al., 2014). Estima-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de sintetizar esta auxina natural e sua função está relacionada principalmente ao alongamento de células, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana; ao passo que é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (TAIZ; ZEIGER, 2012; MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

O AIA é produzido durante todos os estágios de crescimento da cultura bacteriana e bem depois da fase estacionária (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2009). Esta característica faz a rizobactéria ser especialmente qualificada para a promoção do crescimento de plantas, permanecendo o efeito do AIA durante semanas ou meses após a inoculação bacteriana na muda vegetal (BASHAN; BASHAN, 2010). A inoculação com essas bactérias produtoras de AIA tem sido usada para estimular a germinação de sementes, para acelerar o crescimento das raízes, modificar a arquitetura do sistema radicular e aumentar a biomassa de raízes (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010). O principal grupo de bactérias que produz auxina são *Azospirillum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* ssp. e *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN et al., 1998; VESSEY, 2003; BABALOLA, 2010; COUILLEROT et al., 2010).

A produção do ácido indol-3-ácético, auxina mais relacionada com a produção microbiana, é dependente do aminoácido L-triptofano em sua maioria. Segundo Tsavkelova et al. (2006), o L-triptofano é convertido em AIA por várias rotas, como as rotas do ácido indol-3-ácético-pirúvico (AIP), da triptamina (TAM) e do ácido indol-3-acetonitrila (IAN). A rota do AIP é a mais comum das vias dependentes do triptofano, envolvendo uma reação de desaminação para formação do AIP, uma reação de descarboxilação para formar o indol-3-aldeído, que sofre uma oxidação para, em seguida, formar o AIA. A rota da TAM é semelhante à rota do AIP, porém ocorre primeiramente uma descarboxilação, em seguida de desaminação pela ação das enzimas específicas. Na rota IAN, o triptofano é convertido a indol-3-acetaldoxina e, então, a indol-3-acetonitrila. A via independente de L-triptofano, mais comum em plantas, é também encontrada em microrganismos. Em plantas, AIA liga-se a açúcares, aminoácidos e proteínas, que são armazenadas e libertam o fitormônio quando for necessário.

Além da auxina, outros fitormônios também são de grande importância para as plantas, como a citocinina, que promove divisão celular e diferenciação de tecidos meristemáticos de caules e raízes, que está envolvida no processo de atraso da senescência, na formação de órgãos, desenvolvimento de raízes e pelos radiculares e na expansão foliar (DAVIES, 2010). Também media muitos aspectos do desenvolvimento regulado pela luz, incluindo a diferenciação dos cloroplastos, o desenvolvimento do metabolismo autotrófico e a expansão de folhas e cotilédones (TAIZ; ZEIGER, 2012). Dentre as bactérias capazes de sintetizar citocininas, destacam-se os gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum* spp., *Arthrobacter* spp., (VESSEY, 2003; ARKHIPOVA et al., 2007; HUSSAIN; HASNAIN, 2011).

As giberelinas estão envolvidas em processos de divisão celular e alongamento durante todos os estágios de desenvolvimento das plantas (da germinação da semente até o crescimento dos frutos), além de ser determinante no papel da ação de outros hormônios (DAVIES, 2010). Dentre algumas bactérias que são capazes de sintetizar giberelina, pode-se citar *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN et al., 1998; MACMILLAN, 2001).

O ácido abscísico (ABA) atua regulando o fechamento estomático, o amadurecimento dos frutos e inibe a germinação de sementes, é envolvido também na dormência do embrião e na proteção contra estresses abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2012). O único hormônio gasoso é o etileno (ET), que controla muitas fases do desenvolvimento da planta, tais como maturação de frutos climatéricos, senescência de folhas e flores (ALMEIDA; RODRIGUES, 2017). A via de biossíntese do etileno foi descrita por Yang e Hoffman (1984). Segundo o modelo proposto, o aminoácido metionina é o precursor biológico do etileno em todas as plantas superiores e é convertido a etileno pela via de biossíntese que compreende vários passos com reações enzimáticas. A Sadenosil-metionina (SAM), um dos produtos do ciclo de Yang, é convertida em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC-sintase. O ACC é então metabolizado pela enzima ACC-oxidase, por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro, e que é ativada pelo CO₂ para produzir o etileno.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University Science**, Elsevier BV, v. 26, n. 1, p. 1–20, jan 2014.
- ALMEIDA, G. M.; RODRIGUES, J. G. L. Development of plants by interference auxins, cytokinins, gibberellins and ethylene. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 9, n. 3, p. 111–117, 2017.
- ALMEIDA, I. R. de et al. Zoneamento agroclimático para produção de morango no rio grande do sul. **Embrapa Clima Temperado. Documentos**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.
- ANDREOTE, F. D. et al. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 1065–1073, 2009. ISSN 1573-0972. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-9990-9>>.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. d. **A cultura do morango**. 2. ed. Pelotas: Embrapa, 2011. (Coleção Plantar, 68).
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in brazil and south america. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n. 12, p. 156–161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2012.698147>>.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, sciELO, v. 28, p. 222 – 226, 06 2010. ISSN 0102-0536.
- ANTUNES, O. T. et al. Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, SciELO Brasil, v. 24, n. 4, p. 426–430, 2006.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant and Soil**, Springer, v. 292, n. 12, p. 305–315, 2007.
- ASSIS, L.; UCHIDA, N. Análise da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas comercializadas em campo mourão, pr. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 5, n. 3, p. 17–22, 2014.
- ASSUMPCÃO, L. de C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, FapUNIFESP (SciELO), v. 44, n. 5, p. 503–510, may 2009.
- AVIS, T. J. et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier BV, v. 40, n. 7, p. 1733–1740, jul 2008.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, Springer Nature, v. 32, n. 11, p. 1559–1570, jul 2010.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of biosciences**, Springer India, in copublication with Indian Academy of Sciences, v. 31, n. 5, p. 645–650, 2006.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. de. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77 – 136, 2010. ISSN 0065-2113. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211310080028>>.

BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins a1 and a3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Springer Nature, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/a:1005964031159>>.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>>.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, dec 2011.

BOMBARELY, A. et al. Generation and analysis of ests from strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. **BMC genomics**, BioMed Central, v. 11, n. 1, p. 503, 2010.

BOTTA, A. L. et al. In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, Elsevier BV, v. 30, n. 6, p. 666–674, sep 2013.

BUCCI, A.; FAEDI, W.; BARUZZI, G. Origine ed evoluzione. In: **La fragola**. Bologna: BayerCropScience/Script ART Edizioni, 2010.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, Annual Reviews, v. 64, n. 1, p. 807–838, apr 2013.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, Springer Nature, v. 33, n. 2, p. 440–459, aug 2013.

CASTILLO, P. et al. Phytohormones and other plant growth regulators produced by pgpr: The genus *Azospirillum*. In: _____. **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**. Cham: Springer International Publishing. p. 115–138, 2015.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* sp 245 produces ABA in chemically defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, Springer Nature, v. 54, n. 2, p. 97–103, oct 2007.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669 – 678, 2010. ISSN 0038-0717. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071709004398>>.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier BV, v. 42, n. 12, p. 2298–2305, dec 2010.

DAVIES, P. J. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In: _____ **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 1–15. ISBN 978-1-4020-2686-7.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in *iaa* production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 153–162, May 1999. ISSN 1573-5036. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1004658000815>>.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; CAKMAKCI, R. Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. **Journal of Plant Nutrition**, Informa UK Limited, v. 35, n. 6, p. 817–826, apr 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663437>>.

ESITKEN, A. et al. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, Elsevier BV, v. 124, n. 1, p. 62–66, feb 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>>.

FAGHERAZZI, A. F. et al. Speciale fragola: La fragolicoltura brasiliana guarda avanti. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, v. 6, p. 20–24, 2014.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. d.; REIS, F. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FAOSTAT. 2014. Acessado em 07 jun 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>.

FIGUEIREDO, M. B. V. et al. Microrganismos promotores de crescimento de plantas: bactérias promotoras de crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. B. V. (Ed.). **Biotecnologia aplicada a agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Recife: Embrapa. p. 387–414, 2010.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 24, n. 7, p. 1187–1193, nov 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013.

- FORCHETTI, G. et al. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 76, n. 5, p. 1145–1152, jul 2007.
- GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, FapUNIFESP (SciELO), v. 82, n. 0, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657001262013>>.
- GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, Elsevier, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.
- GIRIO, L. A. d. S. et al. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Empresa Brasil Pesq Agropec, p. 33–43, 2015.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.
- GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, Elsevier BV, v. 61, p. 205–212, oct 2012.
- HANCOCK, J. F. et al. Taxonomic variation among north and south american subspecies of *Fragaria virginiana* miller and *Fragaria chiloensis* (L.) miller. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1632–1644, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/b04-113>>.
- HOSSAIN, M. M. et al. Isolation and identification of *Azospirillum* isolates from different paddy fields of north bengal. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology**, Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, v. 3, n. 1, p. 74, 2015.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Documento.
- HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 27, n. 11, p. 2645–2654, apr 2011.
- KANG, S. M. et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, Springer Nature, v. 31, n. 2, p. 277–281, oct 2008.
- KANNAN, T.; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasilense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, 2010.
- KHAN, M. S. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi– current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, Informa UK Limited, v. 56, n. 1, p. 73–98, feb 2010.
- KUMAR, A. et al. Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 715–724, 2015.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C. Plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens and yield enhancement of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Current Perspectives in Applied Microbiology**, v. 1, p. 6–38, 2012.

KURAS, A.; KORBIN, M. Pcoa analysis of strawberry germplasm used in european breeding programs, based on evaluation of dna polymorphism of investigated plants. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 2, n. 18, p. 7–16, 2010.

LÓPEZ-ARANDA, J. M. et al. Strawberry production in mild climates of the world: A review of current cultivar use. **International Journal of Fruit Science**, v. 11, n. 3, p. 232–244, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2011.608294>>.

MACMILLAN, J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, Springer Nature, v. 20, n. 4, p. 387–442, dec 2001.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, Elsevier BV, v. 45, n. 1, p. 73–80, jan 2009.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, jul 2010.

MONTEIRO, N. K. et al. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, Fap UNIFESP (SciELO), v. 35, n. 4, p. 705–708, 2012.

MOREIRA, F. M. d. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

NAZNIN, H. A. et al. Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS83 for growth promotion effects on tobacco. **Microbes and Environments**, Japanese Society of Microbial Ecology, v. 28, n. 1, p. 42–49, 2013.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011.

OLIVEIRA, A. L. M. de et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56–77, 2014.

OLIVEIRA, M. A. d. et al. Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agronômico do milho. **Revista de Ciências Agrárias**, Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal, v. 38, p. 18 – 25, 03 2015. ISSN 0871-018X.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A lavoura**, v. 108, n. 655, p. 35–38, 2005.

OSÓRIO FILHO, B. D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 14, n. 8, p. 707–718, 2014.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 26, n. 2, p. 265–272, sep 2009.

PEREIRA, G. V. de M. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 405–417, 2012. ISSN 1432-184X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9919-3>>.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. de. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, Elsevier BV, v. 22, n. 2, p. 187–193, apr 2011.

PONCE, A. dos R. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SciELO Brasil, v. 30, n. 1, 2010.

PRASAD, R.; KUMAR, M.; VARMA, A. Role of pgpr in soil fertility and plant health. In: _____. **Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 247–260. ISBN 978-3-319-13401-7.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, SciELO Brasil, v. 38, p. 423 – 430, 10 2013. ISSN 1982-5676.

RONQUE, E. R. V. **Cultura do morangueiro: revisão e prática**. Curitiba:EMATER/PR, 1998.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, n. 1, p. 30, 2011.

SALAZAR, S. et al. Fruit yield of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense* rlc1 and rec3 under field conditions. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 32, n. 12, p. 63–66, 2012.

SANTOS, A.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.). **Morango: produção**. Pelotas: Embrapa, 2003. (Frutas do Brasil, 40).

SHILEV, S. Soil rhizobacteria regulating the uptake of nutrients and undesirable elements by plants. In: _____. **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. New Delhi: Springer India, 2013. p. 147–167. ISBN 978-81-322-1287-4.

SILVA, A.; DIAS, M.; MARO, L. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe agropecuário**, v. 28, n. 236, p. 7–13, 2007.

SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANRAJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (pgpr) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **African Journal of Agricultural Research**, Academic Journals, v. 9, n. 16, p. 1265–1277, 2014.

SPAEPEN, S. Plant hormones produced by microbes. In: **Principles of Plant Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 247–256. ISBN 978-3-319-08575-3.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fzb42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 26 – 33, 03 2015. ISSN 0871-018X.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORTORA, M. L.; DÍAZ RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, Springer Nature, v. 193, n. 4, p. 275–286, jan 2011.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Pleiades Publishing Ltd, v. 42, n. 2, p. 117–126, mar 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/s0003683806020013>>.

VEIGA JUNIOR, W. G. O morango e sua evolução comercial. In: CARVALHO, S. d. (Ed.). Boletim do Morango: **Cultivo Convencional, Segurança Alimentar, Cultivo Orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. p. 119–126.

VESSEY, J. K. *Plant and Soil*, Springer Nature, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VIZZOTTO, M. Propriedades funcionais das pequenas frutas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 84–88, 2012.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of experimental Botany**, Oxford University Press, v. 52, n. suppl_1, p. 487–511, 2001.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Annual Reviews, v. 35, n. 1, p. 155–189, jun 1984.

SEGUNDA PARTE

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO EM MORANGUEIRO

RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento em plantas tem se destacado, principalmente, pelo seu potencial na redução de uso de fertilizantes e agrotóxicos usados na produção, devida à capacidade de estimular o crescimento das plantas pela fixação de nitrogênio e produção de hormônios. O trabalho teve como objetivo verificar o potencial de promoção de crescimento de 25 estirpes pertencentes à Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA-UFLA), através de testes de fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético (AIA). Após isso, três estirpes com melhores resultados a partir desses testes, foram inoculadas nas raízes de mudas de morango (cultivar Aromas), em condição de estufas, onde se avaliou o crescimento dessas plantas, e também foi realizado o isolamento dos microrganismos endofíticos das plantas inoculadas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 8×2 , sendo 8 níveis de bactérias com as seguintes combinações: sozinhas, aos pares e as três juntas e sem bactéria, e dois níveis de adubação de 0% de nitrogênio e 50% de nitrogênio, totalizando 16 tratamentos, com oito repetições cada. Após 75 dias avaliou-se: comprimento da raiz (CR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), além do número de folhas (NF), e massa seca total (MST). Os resultados mostram que a cultura do morango respondeu de forma positiva a inoculação das três bactérias (*Ab-V5 Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*) em relação aos controles não inoculados, sendo que o melhor resultado foi à combinação das três bactérias juntas com a adubação de 50% de nitrogênio por acúmulo de matéria seca da parte aérea e da raiz.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento em plantas. Morango. Inoculação.

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria have been detached mainly due to their potential reducing use of fertilizers and pesticides in the production due to the capacity of stimulating the plant growth by nitrogen fixation and production of hormones. The proposed work has aimed to verify the potential of growth-promoting of 25 strains from Agricultural Microbiology Culture Collection of Federal University of Lavras, through tests of nitrogen fixation and indoleacetic acid (IAA) production. Thus, the three strains that perform the best results were inoculated in roots of strawberry seedlings (cultivar *Aromas*), in greenhouse condition, where the plant-growth were evaluated and the endophytic microorganisms isolation of the inoculated plants were realized. The experiment was installed in Completely Randomized Design in factorial scheme 8×2 , where 8 bacteria levels with the following combinations: lonely, in combinatorial pairs, all three and without bacterium, and two fertilization levels (0 and 50% of nitrogen), totalizing 16 treatments with 8 repetitions for each. After 75 days, measures such as root length (RL), root dry mass (RDM), aerial part length (APL), aerial part dry mass (APDM), the number of leaves (FN) and total dry mass (TDM) were evaluated. The results show that the culture of strawberry has answered positively the inoculation of all three bacteria (Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*) in relation to non inoculated controls, is that the best result was the combination of three bacteria with fertilization of 50% nitrogen per cumulative dry mass of aerial part and root.

Keywords: Plant growth-promoting bacteria. Strawberry. Inoculation.

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*, Duch.) é cultivado em diferentes partes do mundo em áreas tropicais e subtropicais, mas se destaca nas regiões de clima temperado, sendo os países maiores produtores os Estados Unidos, Espanha, China, México, Polônia e Japão (FAO, 2014; PEREIRA et al., 2012, MORILLO et al., 2015). É uma fruta rica em frutose e sacarose, além disso, também possui alto teor de vitamina C, contendo também riboflavina, piridoxina, niacina, magnésio, manganês, cálcio, ferro, fósforo e potássio (TACO, 2011, COELHO JUNIOR, 2016a e 2016b). A cultura do morango é muito importante socioeconomicamente pela agregação de mão de obra familiar, já que o cultivo em pequenas propriedades rurais é predominante (PONCE et al., 2010). No Brasil os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo possuem destaque (RADIN et al., 2011).

No sistema orgânico de produção, é proibido o uso de fertilizantes sintéticos de alta solubilidade, pesticidas, reguladores de crescimento e aditivos alimentares para animais. Ao invés disso, é usado biofertilizantes, rotações de culturas, resíduos de colheitas, adubos verdes, cultivo mecânico e aspectos de controle biológico de pragas (ESITKEN et al., 2010). Nesse sistema de cultivo, chama-se atenção à rizosfera, que compreende uma porção do solo que envolve raízes vegetais e é conhecida por uma grande variedade de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) (COMPANT et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014).

Essas bactérias que são benéficas para as plantas, possuem grande interesse para aplicação na agricultura, como biofertilizantes, pesticidas, fitorremediação (COMPANT et al., 2010) e também tem sido cada vez mais estudadas visando à produção de inoculantes para promoção de crescimento vegetal e biocontrole (QUECINE, BATISTA, 2014; LACAVAL, AZEVEDO, 2014). Algumas BPCP podem apresentar mais de um mecanismo que estimule crescimento das plantas (AHMAD et al., 2008). Incluídos nestes mecanismos estão o antagonismo fungos patogênicos, produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de ácidos orgânicos e ácido indolacético (AIA), HCN, a liberação de enzimas (desidrogenase do solo, fosfatase, nitrogenase, etc.) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (BARRIUSO et al., 2008).

Neste contexto, a tecnologia de inoculação com bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), mesmo que fundamentada em microrganismos que apresentem um caráter exótico ao ambiente produtivo, pode auxiliar no encontro da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois são produzidas e atuam sob baixa demanda de energia (OLIVEIRA et al., 2014). A recomendação para uso de inoculantes contendo BPCPs em cultivos agrícolas

comerciais vem ganhando espaço, e estudos nessa linha de pesquisa com formulações comerciais de biofertilizantes disponíveis nos mercados nacional e internacional vem se destacando. Na maioria dos casos, existem estudos científicos corroborando os efeitos dos microrganismos presentes nas formulações comerciais sobre o crescimento e/ou desenvolvimento vegetal (RUSSO et al., 2005; NAIMAN et al., 2009; WALKER et al., 2011).

No entanto, existem poucos relatos sobre o uso de bactérias promotoras de crescimento em morangos. Portanto, o objetivo deste estudo foi selecionar entre as bactérias pertencentes a Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA-UFLA), através dos testes de fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético. Após isso, as bactérias que obtiveram os melhores resultados desses testes, foram inoculadas em mudas de morangueiro da cultivar *Aromas*, em condições de estufa e avaliou-se o crescimento dessas plantas. Foi também realizado o isolamento dos microrganismos endofíticos das plantas inoculadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes utilizadas

As estirpes bacterianas utilizadas foram cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Para os primeiros testes, foram escolhidas bactérias conforme gêneros e espécies descritas na literatura como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Foram selecionadas 25 bactérias, para padronização (Tabela 2.1).

As estirpes mantidas a 80 C foram reativadas em meio líquido caldo nutriente (3 g L⁻¹ de extrato de carne; 5 g L⁻¹ de peptona) e incubadas em BOD a 30 C, por 48 horas e em meio líquido 79 ou YMA sem adição de azul de bromotimol para o cultivo da bactéria *Azospirillum brasilense* (10 g L⁻¹ de manitol ou sacarose; 1 mL de solução K₂HPO₄ (10%); 4 mL de solução KH₂PO₄ (10%); 2 mL de solução MgSO₄. 7H₂O (10%); 1 mL de solução NaCl (10%); 0,4 g L⁻¹ de extrato de Levedura; pH 6; 8 7; 0) e incubadas em BOD a 30 C, por 48 horas.

2.2 Fixação biológica de nitrogênio

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. As estirpes listadas na Tabela 2.1 foram testadas quando a capacidade de fixar nitrogênio N₂ atmosférico. Foram utilizados dois meios de cultura NFb semissólido, cuja formulação apresenta 5 g L⁻¹ de ácido málico; 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ de NaCl; 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina; 20 mg de piridoxol HCl em 100 mL de solução); 2 mL de solução de micronutrientes (0,2 g de Ca₂MoO₄.2H₂O; 0,235 g de MnSO₄.H₂O; 0,28 g de H₃BO₃; 0,008 g de CuSO₄.5H₂O; 0,024 g ZnSO₄.7H₂O em 200 mL de solução); 4 mL de solução de FeEDTA (solução 1,64%), 2 mL de azul de bromotimol (solução a 0,5% em 0,2 N de KOH); 4,5 g L⁻¹ de KOH; o pH foi ajustado para 6,8 (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) e adicionado 1,75 a 1,8 g L⁻¹ de agar (variável, de acordo com a marca do agar). A estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, cedida pela Embrapa Londrina, foi inserida nos testes como estirpe controle, devido à comprovada capacidade em produzir AIA (PEDRINHO et al., 2010; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2015).

Tabela 2.1 – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento

Código	Espécie	Origem geográfica	Substrato/ Hospedeiro
CCMA 0010	<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	Parque do Xingú-MT, Brasil	Bebida indígena- (Caxiri)
CCMA 0054	<i>Bacillus subtilis</i>	Passos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Pimenta-do-Mato
CCMA 0085	<i>Bacillus subtilis</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Marolo
CCMA 0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Marolo
CCMA 0101	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Marolinho
CCMA 0401	<i>Bacillus subtilis</i>	Tribo indígena-MT, Brasil	Bebida indígena- Chicha (Arroz)
CCMA 0549	<i>Bacillus subtilis</i>	Parque do Xingú-MT, Brasil	Bebida Indígena (Caxiri)
CCMA 0087	<i>Bacillus subtilis</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto do Cerrado (Marolo)
CCMA 0082	<i>Burkholderia phenazinium</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Ananás
CCMA 0113	<i>Burkholderia multivorans</i>	Luminárias-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Murici-do-cerrado
CCMA 0448	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Lavras-MG, Brasil	Grão de café (via úmida)
CCMA 0056	<i>Burkholderia cepacia</i>	Passos, MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Pimenta-do-Mato
CCMA 0551	<i>Bacillus subtilis</i>	Arcos-MG, Brasil	Solo do Cerrado (Estação seca)
CCMA 0550	<i>Bacillus subtilis</i>	Passos-MG, Brasil	Solo do Cerrado (Estação úmida)
CCMA 0083	<i>Burkholderia sordicola</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Ananás
CCMA 0457	<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	Lavras-MG, Brasil	Grão de café (via úmida)
CCMA 1269	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Fazenda Datterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
CCMA 1254	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Fazenda Datterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
Ab-V5	<i>Azospirillum brasilense</i>	EMBRAPA Londrina-PR	-
UNIFENAS 100-13	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Solos de pastagem, Alfenas-MG, Brasil	Rizosfera de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
UNIFENAS 100-39	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Solos de pastagem, Alfenas-MG, Brasil	Rizosfera de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu

Fonte: ANDRADE, 2017

Tabela 2.1 – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento “conclusão”

Código	Espécie	Origem geográfica	Substrato/ Hospedeiro
CCMA 1285	<i>Enterobacter cloacae</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
CCMA 1286	<i>Bacillus pumilus</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
CCMA 1287	<i>Bacillus subtilis</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
CCMA 1288	<i>Lysinibacillus amylolyticus</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café

Fonte: ANDRADE, 2017.

O outro meio de cultura utilizado foi o JMV semissólido para crescimento de *Burkholderia* spp. a estirpe UNIFENAS 100-13 *Burkholderia cenocepacia* foi usada como controle positivo, apresenta 5 g L⁻¹ de manitol; 0,6 g L⁻¹ K₂HPO₄; 1,8 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ NaCl; , 0,02 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 2 mL de solução de micronutrientes; 2 mL de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH); 4 mL de solução de FeEDTA (solução 1,64%); 1 mL de solução vitaminas; pH 4; 2 4; 5 (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000) e adicionar e adicionar 2,5 g L⁻¹ de agar (variável, de acordo com a marca do agar).

Os meios foram transferidos para tubos de ensaio com 6 mL de meio de cultura, sendo autoclavado a 121 C por 15 minutos, em triplicata. Após os meios solidificarem, a inoculação das bactérias foi realizada por meio da raspagem da colônia da placa de Petri com culturas de 48 h, usando alça de platina com a ponta fina, introduzindo as colônias até o final dos tubos. Os tubos foram incubados em BOD a 30 C, e avaliados diariamente por até 12 dias. A avaliação foi feita visualmente e, como resultado positivo, a formação de uma película aerotóxica típica próxima à superfície do meio, indicando que a fixação de nitrogênio ocorreu, uma vez que há redução do nitrogênio atmosférico em amônia, podendo ou não haver mudança de coloração de verde intenso para verde azulado ou azul no caso para o meio NFb semissólido (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Essa mudança de coloração indica alteração do pH do meio, sendo a coloração amarelada representando o meio ácido e a coloração azulada representando o meio básico. No meio JMV semissólido uma película também é formada na superfície do meio 4 a 5 dias após a incubação. A presença da película aerotóxica é constituída de células bacterianas conforme descrito por Kuss et al. (2007).

2.3 Produção do fitohormônio vegetal - auxina (ácido-3-indolacético)

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. As estirpes listadas na Tabela 2.1 foram testadas quando a capacidade de produzir ácido-3-indolacético (AIA). A produção de auxina foi determinada utilizando a metodologia adaptada de Gordon e Weber (1951) e Loaces, Ferrando e Scavino (2011). As estirpes congeladas em ultrafreezer foram cultivadas em tubos de ensaio com meio de cultura caldo nutriente, incubados a em BOD a 30 C, por 48 horas em quadruplicada. Posteriormente, foi ajustado à densidade óptica entre 0,5 (10^7 - 10^8 CFU mL⁻¹) a 600 nm no equipamento espectrofotômetro. Foram transferidos 5% (v/v) com auxílio de uma pipeta automática para os tubos de ensaio com meio de cultura caldo nutriente, suplementado com triptofano (100 mg/mL) e incubados novamente em BOD a 30 C, por 72 horas no escuro. Após esse tempo foi feita a centrifugação por 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante da cultura foi recuperado.

A produção de auxina foi determinada pela mistura de 1 mL do sobrenadante com 1 mL do Reagente de Salkowski (1,875 g de FeCl₃.6H₂O, 100 mL de H₂O e 150 mL de H₂SO₄ a 35%) (GORDON; WEBER, 1951; LOACES; FERRANDO; SCAVINO, 2011). A mistura foi incubada em BOD a 30 C, por 15 minutos no escuro. Novamente foi feita uma leitura no equipamento espectrofotômetro, ajustada a densidade óptica a 530 nm e medido a OD de cada amostra. A quantificação foi feita por uma curva padrão a partir da solução de AIA contendo 1 mg/mL. A coloração rosa-avermelhada das amostras indica a produção de auxina. Como controle positivo para esse teste será utilizada a bactéria Ab-V5 *Azospirillum brasiliense*.

2.4 Experimento, delineamento e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos períodos entre os meses de Julho de 2016 a Março de 2017. A UFLA situa-se no município de Lavras, considerado sul do Estado de Minas Gerais, a uma altitude média de 919 metros, latitude de 21 14' S e longitude de 45 00' W Gr. O clima da região de Lavras é do tipo Cwb, (clima mesotérmico ou tropical de altitude), com duas estações bem definidas, uma fria e seca, de Abril a Setembro, e outra quente e úmida, de Outubro a Março, segundo a classificação de Köppen (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007).

O experimento foi utilizado o solo denominado Latossolo Vermelho Distroférico (EMBRAPA, 2006). Amostras de solo da camada de 0 a 20 cm foram coletados para realização da análise química e física que foi realizada antes da montagem do experimento: pH em água = 5,0; P = 0,634 mg/dm³; K = 41,79 mg/dm³; Na = 6,19 mg/dm³; Ca = 0,40 cmol/dm³; Mg = 0,20 cmol/dm³; H+Al = 8,60 cmol/dm³; T = 9,31 cmol/dm³; V = 7,60%; M.O. = 3,50 dag/kg; Zn = 0,86 mg/dm³; Fe = 181,16 mg/dm³; Mn = 6,55 mg/dm³; Cu = 1,76 mg/dm³; B = 0,27 mg/dm³; S = 4,72 mg/dm³; Argila = 66 dag/kg; Silte = 8 dag/kg, Areia = 26 dag/kg e Nitrogênio total 2,4 g/kg. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Solo e Física do Solo do Departamento de Ciências do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O solo utilizado foi coletado dentro da Universidade Federal de Lavras, aproximadamente 600 kg de solo. Após a coleta foi peneirado e colocado para secagem com reviragens diárias até a completa secagem (aproximadamente 15 dias). Após esse período foi necessário realizar a calagem no solo calculado pelo Método de Saturação de Base adicionando carbonato de cálcio e carbonato de magnésio. Depois do tempo da calagem (15 a 20 dias) o solo foi colocado em sacos plásticos autoclaváveis (aproximadamente 4,5 kg) e foram esterilizados em autoclave por duas vezes, em dias alternados, a 121 C por uma hora e meia.

O solo estéril foi colocado em vaso, e feita adubação conforme as recomendações de Malavolta (1980) para a 5 aproximação do solo. A adubação foi feita no plantio o qual foi adicionado no solo uma solução micronutrientes (2,17 H₃BO₃, 5 g CuSO₄.5H₂O, 5,67g MgSO₄.H₂O, 0,167 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 17,17 g ZnSO₄.7H₂O dissolvidos em 2 L de água destilada), 11,5 g/vaso superfosfato simples, 0,34 g/vaso sulfato de potássio e diferentes doses de ureia de 0% e 50% da recomendação desejada pela cultura.

Depois somente a adubação de sulfato de potássio e ureia foi realizada quinzenalmente até 75 dias do experimento. Foram utilizadas mudas de morangos com raízes da cultivar Aromas, com aproximadamente 1 mês. Para adaptação da planta, a inoculação das bactérias foi realizada 15 dias após o plantio. A Tabela 2.2 mostra a combinação de bactérias inoculadas por tratamento aplicado ao experimento, sendo que as bactérias A, B e C foram selecionadas a partir dos testes de Fixação de Nitrogênio e Produção de Auxina.

O delineamento estatístico do experimento foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 8 × 2, sendo 8 níveis de bactérias (Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, com as seguintes combinações: sozinhas, aos pares e as três juntas), e dois níveis de adubação de 0% de

nitrogênio e 50% de nitrogênio, totalizando 16 tratamentos, com oito repetições cada, totalizando 128 vasos.

Tabela 2.2 – Tratamentos usados no experimento

Tratamento	Sigla	Método
Controle 1	C1	Sem bactéria, com adubação, sem N
Controle 2	C2	Sem bactéria, com adubação, com 50% de N
Tratamento 3	T3	Ab-V5, com adubação, sem N
Tratamento 4	T4	CCMA 0056, com adubação, sem N
Tratamento 5	T5	CCMA 1285, com adubação, sem N
Tratamento 6	T6	Ab-V5 + CCMA 0056, com adubação, sem N
Tratamento 7	T7	Ab-V5 + CCMA 1285, com adubação, sem N
Tratamento 8	T8	CCMA 0056 + CCMA 1285, com adubação, sem N
Tratamento 9	T9	Ab-V5 + CCMA 0056 + CCMA 1285, com adubação, sem N
Tratamento 10	T10	Ab-V5, com adubação, com 50% de N
Tratamento 11	T11	CCMA 0056, com adubação, com 50% de N
Tratamento 12	T12	CCMA 1285, com adubação, com 50% de N
Tratamento 13	T13	Ab-V5 + CCMA 0056, com adubação, com 50% de N
Tratamento 14	T14	Ab-V5 + CCMA 1285, com adubação, com 50% de N
Tratamento 15	T15	CCMA 0056 + CCMA 1285, com adubação, com 50% de N
Tratamento 16	T16	Ab-V5 + CCMA 0056 + CCMA 1285, com adubação, com 50% de N

Legenda: Bactérias selecionadas a partir dos testes de fixação de nitrogênio e produção de auxina. Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, SEM (sem bactéria), N: nitrogênio.

Fonte: ANDRADE, 2017

2.5 Bactérias, preparo do inoculante e avaliações do crescimento

Para o experimento os inoculantes foram preparados no Laboratório de Microbiologia das Fermentações, localizado no Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Conforme o melhor resultado dos testes de fixação de nitrogênio e produção de auxina, feito com as 25 bactérias da Coleção de Culturas CCMA, foram selecionadas 3 bactérias para a inoculação nas raízes dos morangos.

As estirpes foram preparadas separadamente, cultivadas em meio caldo nutriente, a 30°C, até atingir a concentração de 1×10^9 UFC mL⁻¹. Para o cálculo da viabilidade das células e determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), as culturas crescidas foram diluídas serialmente até a diluição de 10⁻⁸, plaqueadas nas diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ contadas pela técnica de microgota.

Após a incubação e contagem do crescimento, as células foram centrifugadas a 9000× g durante 10 min e lavadas duas vezes com tampão fosfato, com pH 7,0, para remover qualquer cultura resíduo meio que poderia interferir no crescimento sobre plantas de morango.

Alíquotas de 6 ml a partir de as suspensões bacterianas (10^9 UFC mL⁻¹) foram inoculados nas raízes conforme cada tratamento. As plantas foram regadas todos os dias com água destilada estéril. No total, oito plantas foram inoculadas para cada tratamento. O controle consistiu em um conjunto de oito plantas que não foram inoculados. Os vasos foram dispostos ao acaso e mantidos em uma estufa (com temperaturas médias em 30°C).

As inoculações foram feitas quinzenalmente em um total de 5 inoculações (0,15, 30, 45 e 60 dias). A cada inoculação, foram anotados os dados do crescimento da planta como número de folhas e diâmetro das plantas (medido por um paquímetro), considerando as extremidades de duas folhas opostas que apresentaram a maior dimensão, conforme ilustrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Inoculação nas raízes do morango e medições com paquímetro.



Fonte: ANDRADE, 2017.

Após o período de 75 dias de experimento, foram avaliadas as características do desenvolvimento e crescimento das plantas, tais como comprimento da raiz (CR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), aferidas em balança analítica de precisão com quatro casas decimais (g), além do número de folhas (NF), e massa seca total pela soma da MSR + MSPA. As plantas foram acondicionadas em sacos de papel e identificadas. Em seguida, foram encaminhadas para a estufa de secagem, com circulação forçada de ar a 60°C. O peso foi aferido em três momentos distintos: 24, 48, e 72 horas em balança analítica de precisão, para que fosse estabilizado.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de *software* R (*R Development Core Team*, 2016), utilizando o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura, foram utilizadas as raízes frescas dos morangos, dos 16 tratamentos e as três bactérias inoculadas. As amostras foram cortadas à mão livre com bisturi e colocadas em microubros de 1,5mL contendo o fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl_2 0,001 M, pH 7,2) e, armazenados em geladeira, a 4°C, por um período de no mínimo 24 horas. Para as 3 bactérias inoculadas foram crescidas em meio de cultura sólido para verificação da pureza, com a alça de platina foi feita uma suspensão de cada bactéria em água destilada estéril em microtubos de 1,5mL e em seguida foi adicionado o fixador Karnovsky e também, armazenados em geladeira, a 4°C, por um período de no mínimo 24 horas.

Após a fixação, foi utilizado o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrita por Bozzola e Russel (1999) com algumas modificações. As amostras das raízes pré fixadas foram retiradas do fixador Karnovsky e colocadas em glicerol por um período de 30 minutos, e posteriormente, foram efetuados os cortes das raízes em nitrogênio líquido (criofatura). Em seguida, foram lavadas em água destilada, por três vezes e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100%, por três vezes).

Para as amostras das suspensões das bactérias foram preparadas placas de Petri com 3 cm de diâmetro, previamente identificadas, dentro dessas placas foram colocadas uma lamínula pequena e redonda que tinha Poly-L-Lysine que foi espalhada com bastonete de algodão limpo e deixado secar por 10 minutos. A suspensão da bactéria foi agitada e pipetada 60 μ L sobre a lamínula deixando aproximadamente 20 minutos aderir o material. Após isso vou adicionado o tampão Cacodilato 0,05M em quantidade suficiente para cobrir a amostra, esperou-se 10 minutos, por duas vezes foi repetida essa operação. Em seguida seguiu o procedimento de desidratação em gradiente acetona igual das amostras das raízes.

Após a desidratação, as amostras das raízes e das bactérias foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO_2 e complementação da secagem. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs) com fita de carbono sobre uma película de papel de alumínio e cobertos com ouro no

evaporador Balzers SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens geradas foram gravadas e abertas no *software* Corel Photopaint de pacote Corel Draw X7, para preparação das pranchas.

2.7 Isolamento das bactérias endofíticas das folhas, caules e raízes do morango pós-inoculação

O isolamento das bactérias endofíticas do morango pós-inoculação foi baseado no protocolo utilizado por Barretti et al. (2008). Folhas das plantas de morangos, aparentemente saudáveis, de todos os tratamentos foram coletadas, lavadas em água corrente e enxugadas com papel absorvente. Em seguida, realizou-se a desinfestação superficial com álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 6 minutos e lavagem em água destilada esterilizada por três vezes. Os fragmentos do tecido foram macerados em água estéril e o macerado deixado em repouso por 15 minutos para a difusão das bactérias para a solução.

Após esse período, as suspensões bacterianas obtidas foram semeadas, pelo método de estrias paralelas, em placas contendo o meio 523 de Kado e Heskett (1970) ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sacarose, $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ caseína ácida hidrolisada, $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ extrato de levedura, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), incubadas a 28°C e em triplicata.

Após o período de incubação, procedeu-se a contagem de colônias, de forma que, apenas as placas que continham de 30 e 300 colônias de cada meio fossem utilizadas para realização do cálculo UFC (Unidade Formadora de Colônias). Desta maneira, estas foram utilizadas para a classificação de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos (tamanho, forma, elevação, brilho, textura e cor). Após selecionar os morfotipos, foi realizado o isolamento e purificação destes por meio de estrias compostas em placa de Petri contendo o meio 523.

Para se confirmar a natureza endofítica dos isolados o fragmento de planta, após a terceira lavagem do processo de desinfestação, foi seccionado em duas partes. Uma delas foi macerada, conforme já descrito, e a outra foi mergulhada rapidamente em tubo de ensaio contendo o meio 523 líquido e imediatamente retirada. O material no tubo de ensaio também foi incubado a 28°C e observado, a fim de se comprovar a ausência de crescimento de organismos epifíticos. Não havendo crescimento bacteriano nesses tubos de ensaio, os isolados obtidos pela maceração dos tecidos foram considerados endofíticos.

As raízes foram cuidadosamente lavadas em água de torneira, transferidas para frascos contendo solução tampão fosfato-potássio (PB) 0,02 M esterilizada (pH 7,0) e submetidas à

agitação vigorosa em agitador orbital por 1 hora. Essa operação foi repetida por quatro vezes, após a troca da solução PB. Em seguida, procedeu-se a desinfestação superficial das raízes com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, seguida de três lavagens em solução PB esterilizada. Para desalojar da superfície do material vegetal as bactérias epifíticas remanescentes, as raízes foram transferidas para frascos contendo solução PB 0,02 M esterilizada (pH 7,0) e submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos. Nova desinfestação superficial das raízes foi feita em hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, seguida de três lavagens em solução PB esterilizada.

A seguir, as raízes foram transferidas para frascos com solução PB esterilizados e submetidas a novo banho de ultra-som por 10 minutos. A trituração das raízes foi feita em almofariz e pistilo esterilizados contendo PB e o triturado novamente submetido a banho de ultra-som por 10 minutos, desta vez para desagregação das partículas e células bacterianas.

Procedeu-se a diluição em série em solução PB com fator diluição 1:10. Alíquotas de 100µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} foram retiradas e transferidas para placas de Petri contendo meio Tryptic Soy Agar (TSA) (15 g L^{-1} triptona, 5 g L^{-1} peptona de soja, 5 g L^{-1} cloreto de sódio) e espalhadas com alça de Drigalsky. Foram preparadas cinco placas por diluição, que foram incubadas a 28°C durante 48 horas.

Após o período de incubação, procedeu-se a contagem de colônias, de forma que, apenas as placas que continham de 30 e 300 colônias de cada meio fossem utilizadas para realização do cálculo UFC. Seguiu-se o mesmo procedimento feito das folhas para as características e estruturas morfológicas para selecionar os morfotipos. Após isso, foi realizado o isolamento e purificação destes por meio de estrias compostas em placa de Petri contendo o meio TSA.

Para confirmar a natureza endofítica dos isolados, 100 µL da solução de PB utilizada após o segundo banho de ultra-som foram transferidas para placas de Petri, contendo o meio TSA e incubadas nas mesmas condições para as placas preparadas com as diluições dos triturados. Não havendo crescimento bacteriano nessas placas dentro de 48 horas, os isolados obtidos pela trituração das raízes foram considerados endofíticos. Para confirmar a purificação dos isolados foi utilizado teste de coloração de GRAM e posteriormente, transferidos para criotubos contendo meios de cultivo acrescidos de glicerol para uma concentração final de 20% e conservados em freezer.

2.8 Análise proteica das células bacterianas

Os isolados foram identificados usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™). As células foram cultivadas em placas de petri com meio de cultura específico conforme feito no isolamento e foram incubadas a 28°C durante 18 h e depois aproximadamente 3×10^7 células de cada estirpe foram transferidas assepticamente para microtubos. Posteriormente, foram adicionados 6 µL de solução orgânica (água/acetoneitrilo/ácido trifluoroacético, 50: 47,5: 2,5) a cada microtubo, contendo os isolados bacterianos. Os microtubos foram submetidos de forma rápida e vigorosa durante 1 min e depois transferiram 1 µL da suspensão resultante para a placa alvo MALDI de 96 poços (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Quando a fase líquida foi quase evaporada, adicionou-se 1 µL de solução matricial (solução saturada de ácido aciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em 50% de acetoneitrilo/2,5% de ácido trifluoroacético) e a solução foi misturada suavemente (OLIVEIRA et al., 2015). Uma colônia de *Escherichia coli* K12 foi obtida da Coleção de Cultura Pública Micoteca da Universidade do Minho (MUM, www.micoteca.deb.uminho.pt) e utilizada para extração das proteínas como padrão para o MALDI-TOF para a calibração externa do MS. As células de *E. coli* K12 foram cultivadas em Agar Luria-Bertani (LB, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) a 37°C durante 18h.

Cada amostra MALDI-TOF foi realizada em triplicata para avaliar a reprodutibilidade. As amostras foram então analisadas em um espectrômetro MALDI-TOF microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), utilizando o sistema automático MALDI Biotyper 3.0. Para a identificação microbiana MALDI-TOF, a seguinte referência da Coleção Cultura de Microbiologia Agrícola (CCMAUFLA, <http://www.ccma.dbi.ufla.br>) foram utilizados: CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, CCMA 0054 *Bacillus subtilis*, CCMA 0085 *Bacillus subtilis*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das bactérias

Na Tabela 3.1 encontram-se o resultado dos primeiros testes (produção de auxina e fixação de N₂) das 25 estirpes pertencentes à CCMA/UFLA-MG.

Tabela 3.1 – Testes de Produção de Auxina e Fixação de nitrogênio das estirpes (CCMA-UFLA)

CÓDIGO	ISOLADO	AIA (µg/mL)	Fixação de N ₂	
			NFb	JMV
CCMA 0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	3,698 a	+	-
CCMA 0101	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	3,312 a	+	-
CCMA 0056	<i>Burkholderia cepacia</i>	3,105 a	+	-
CCMA 1285	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,869 a	+	-
Ab-V5	<i>Azospirillum brasilense</i>	2,488 a	+	-
CCMA 1269	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	2,463 a	-	+
UNIFENAS 100-13	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2,363 a	+	+
CCMA 0401	<i>Bacillus subtilis</i>	2,210 a	+	-
CCMA 1288	<i>Lysinibacillus amylolyticus</i>	2,065 a	+	-
CCMA 0551	<i>Bacillus subtilis</i>	2,017 a	+	-
CCMA 0549	<i>Bacillus subtilis</i>	1,824 a	+	-
CCMA 0113	<i>Burkholderia multivorans</i>	1,268 b	+	-
CCMA 0082	<i>Burkholderia phenazinium</i>	1,188 b	+	-
CCMA 0085	<i>Bacillus subtilis</i>	1,114 b	+	-
CCMA 1287	<i>Bacillus subtilis</i>	1,074 b	+	-
CCMA 0448	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1,074 b	-	-
CCMA 0083	<i>Burkholderia sordicola</i>	1,006 b	+	-
CCMA 0054	<i>Bacillus subtilis</i>	0,947 b	+	-
CCMA 0010	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.	0,796 b	+	-
CCMA 0457	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,779 b	+	-
UNIFENAS 100-39	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	0,714 b	+	+
CCMA 0550	<i>Bacillus subtilis</i>	0,626 b	+	-
CCMA 1286	<i>Bacillus pumilus</i>	0,597 b	+	-
CCMA 1254	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0,561 b	+	-
CCMA 0087	<i>Bacillus subtilis</i>	0,387 b	+	-

Legenda: AIA: Ácido Indol Acético. Fixação de N: medida pela presença da película de crescimento em meio semissólido sem nitrogênio NFb e JMV como (+) positivo e (-) negativo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: ANDRADE, 2017.

As estirpes apresentaram produção de AIA variando entre 0,39 e 3,70 µg/mL. Os valores de AIA obtidos estão de acordo com os encontrados em outros estudos, nos quais, observaram-se também variabilidade na capacidade de produzir este fitohormônio pelas estirpes bacterianas (PEDRINHO et al. 2010; CHAVES et al., 2015). Os melhores resultados foram as estirpes, CCMA 0088 *Bradyrhizobium japonicum*, CCMA 0101 *Burkholderia cenocepacia*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* e Ab-V5 *Azospirillum brasilense* que produziram 3,70; 3,31; 3,10 ; 2,86 e 2,48 µg/mL, respectivamente.

De modo geral a produção de AIA observada para as bactérias testadas está dentro do esperado, pois cada isolado vai apresentar diferentes produções, dependendo do modo de cultivo e da estirpe utilizada (CASSÁN et al, 2014). Dados apresentados por Dias et al., (2009), relataram menor produção de AIA por *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, endofíticos em morangos, encontrando produções menores de 5 µg/mL, e promoveram crescimento quando inoculados em mudas de morangos, semelhantes a encontradas também nesse trabalho.

A detecção da produção de AIA pela estirpe CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, nesse trabalho foram 2,86 µg/mL, sendo valor maior comparados nos estudos de George et al., (2013) com produção de 2,40 µg/mL com o mesmo gênero. Verificou-se que as estirpes CCMA 0101 *Bradyrhizobium* e CCMA 0101 *Burkholderia cenocepacia* a dosagem de produção de AIA superior em relação ao controle utilizado (Ab-V5 *Azospirillum brasilense*) indicando possíveis estirpes a serem utilizadas como inoculantes em outros trabalhos.

Os resultados de produção de AIA encontrados por Pereira et al., (2012) em relação ao gênero *Bacillus* que variou de 1,36 a 19,42 µg/mL, sendo que os valores encontrados nesse trabalho foram relativamente nesse intervalo de produção também para esse gênero (0,38 a 2,21 µg/mL), e inferiores ao controle utilizado (2,48 µg/mL). Apesar dos resultados apresentarem concentrações menores de AIA que em outros trabalhos, podem contribuir para o desenvolvimento do morango. A produção desse hormônio pode ainda ser influenciada por outros fatores como condições médias de pH, disponibilidade de substratos, presença de

ácidos orgânicos, metais e fase de crescimento do microrganismo (FRANKENBERGER, ARSHAD 1995; MARTINEZ-VIVEROS et al. 2010; JHA, 2012).

Todas as estirpes (exceto as CCMA 0448 *Paenibacillus amylolyticus*, e 413 *Paenibacillus illinoisensis*) foram capazes de fixar nitrogênio em vida livre para o meio NFb. Já para o meio JMV, apenas as estirpes UNIFENAS 100-13 *Burkholderia cenocepacia*, UNIFENAS 100-39 *Burkholderia cenocepacia* e CCMA 1269 *Paenibacillus illinoisensis* tiveram resultados positivos. A Figura 3.1 mostra a representação do halo de crescimento (película) que indica estirpes positivas.

Figura 3.1 – Teste de fixação de nitrogênio em meio NFb (A) e JMV (B)



Fonte: ANDRADE, 2017.

A partir dos resultados desses testes (produção de AIA e fixação de nitrogênio) e pela análise de médias (tabela 3.1), as três bactérias que apresentaram melhores resultados para segunda parte do experimento foram a Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*.

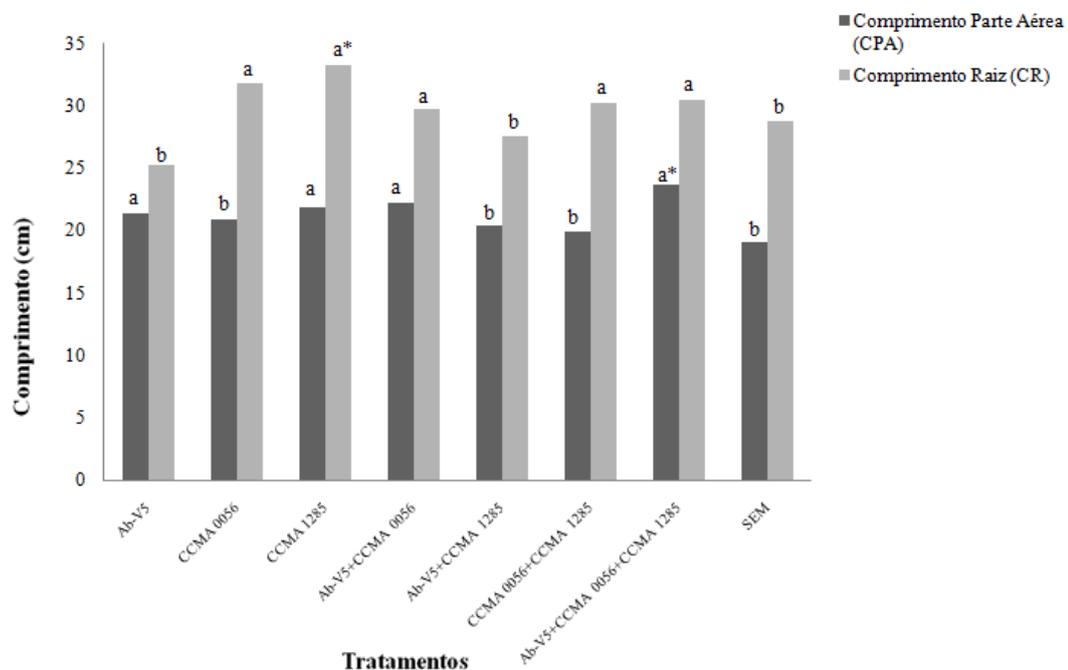
3.2 Avaliações do crescimento do morango

Com base nos valores obtidos no teste *in vitro*, foram selecionados três microorganismos para testes de promoção do crescimento e inoculados em mudas de morango. Aos 75 dias após a primeira inoculação, avaliou-se comprimento da parte aérea e sistema radicular; massa seca da parte aérea, raiz e total e o diâmetro médio da coroa das plantas ao longo do tempo de inoculação. Foram calculadas as médias das variáveis

analisadas e realizado o teste estatístico que apresentou significância pelo teste de Scott Knott $p < 0,05$.

Na Figura 3.2 indica os parâmetros avaliados do crescimento do morango (comprimento da parte aérea e raiz). De acordo com os resultados obtidos apresentou significância para a presença das bactérias, mas não houve efeito significativo da interação da adubação com nitrogênio. O maior comprimento da parte aérea foi das plantas inoculadas com a combinação das três bactérias juntas Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* que apresentou o valor de 23,65 cm, o menor valor foi encontrado nas plantas não inoculadas, ou seja, sem bactéria ‘SEM’, que foi de 19,01 cm e o coeficiente de variação foi de 8,76%. O maior comprimento da raiz foi considerado das plantas inoculadas com a bactéria CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* que apresentou valor de 33,13 cm, o menor valor de raiz encontrado foi das plantas inoculadas com Ab-V5 *Azospirillum brasilense* que foi de 25,16 cm, e 28,71 cm foi o comprimento para as plantas que não foram inoculadas ‘SEM’ e o coeficiente de variação foi de 11,28%.

Figura 3.2 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango (Comprimento Parte Aérea e Raiz)



Legenda: Comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR). Bactérias Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, ‘SEM’ (sem bactéria). *(Maior valor). Médias seguidas da mesma letra de cada parâmetro avaliado, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

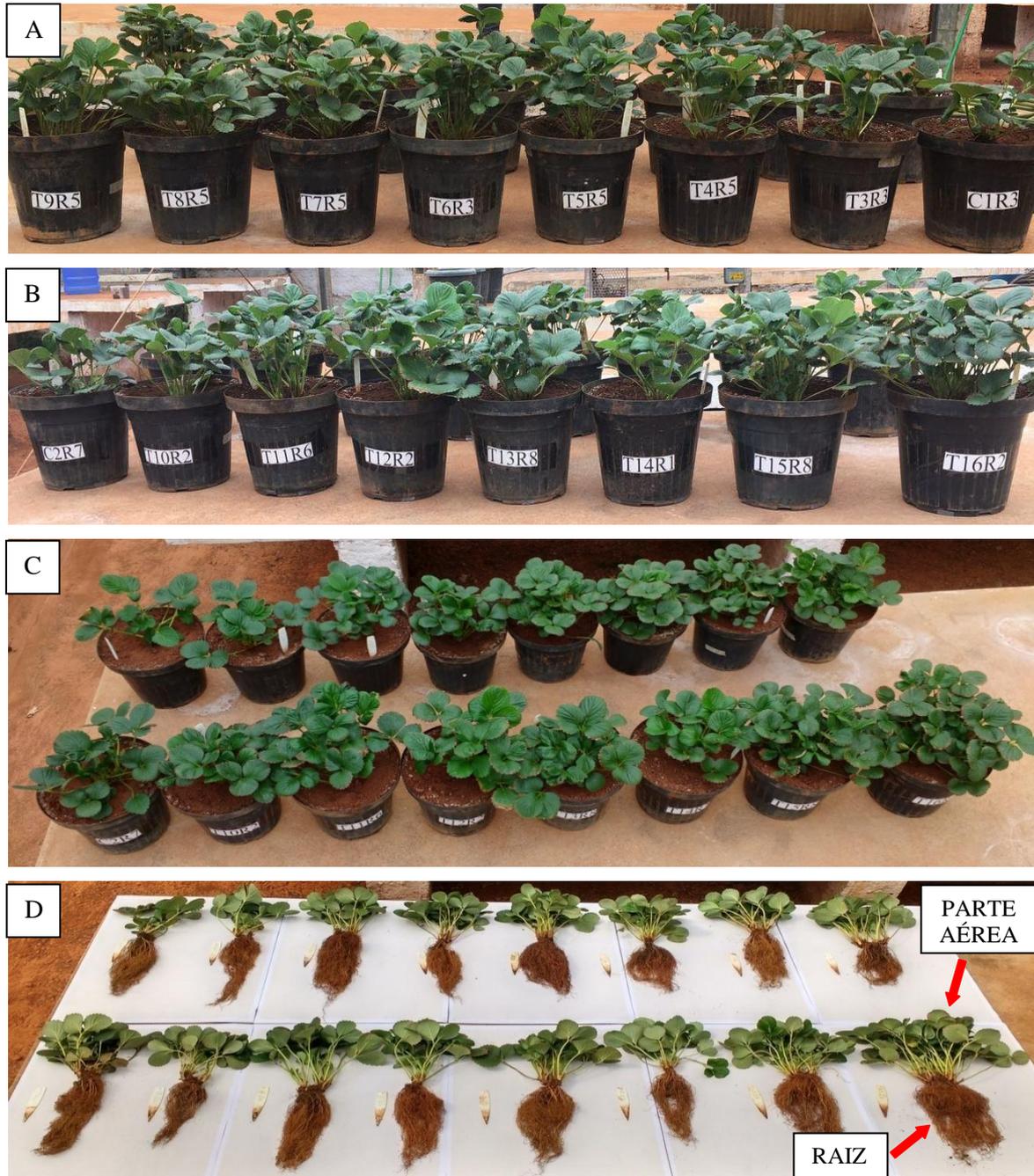
Neste estudo, foi demonstrado aumento no crescimento (comprimentos de parte aérea e raiz) das plantas pelas bactérias inoculadas em relação ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Botta et al., (2013) na avaliação de inoculações utilizando combinações de diferentes bactérias para o tomate, verificando também um aumento no comprimento da raiz das plantas inoculadas com mais de uma bactéria em relação ao controle não inoculado, assim visto também nesse trabalho, relacionando a simbiose entre planta e microrganismo.

Trabalhos semelhantes foram encontrados por Deepa et al. (2010) com a inoculação de *Enterobacter cloacae* em mudas de feijão-caupi, verificaram efeito positivo das plantas inoculadas, com influência considerável no comprimentos de raiz e parte aérea em comparação com o controle não inoculado, além de aumento significativo na biomassa dessa raiz e parte aérea, bem como o aumento no número de raízes. Já a bactéria *Burkholderia cepacia* segundo Zhao et al. (2014) com inoculação em milho, tanto a área da folha quanto os comprimentos e pesos secos das raízes e parte aérea foram significativamente maiores em plantas inoculadas em relação ao controle. Em comparação com trabalhos que inocularam a bactéria *Azospirillum brasilense*, que foi isolada de diferentes tecidos de morango, Pedraza et al. (2010) encontraram valores de comprimento de raiz, variando de 13,6 a 19,4 cm após 54 dias de inoculação; sendo as plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (isolado de tecidos internos de estolões de morango da cultivar *Milsei*) o valor mais alto do que a controle sem inoculação.

Como a ausência ou a presença da adubação com nitrogênio (no caso, 50%) não foi significativa nesse estudo, podemos sugerir também que os comprimentos da parte aérea e raiz foram influenciados pelas bactérias inoculadas. A inoculação inferiu no sistema radicular uma vez que o comprimento das partes aéreas e raízes foram maiores que os não inoculados. Esse fenômeno pode ser sugerido à capacidade de cada bactéria produzir AIA, pois esse hormônio é proposto como um dos principais meios para alcançar a promoção do crescimento e desenvolvimento das raízes, aumentando assim a absorção de nutrientes (KHALID et al., 2004; DEEPA et al, 2010) e conseqüentemente um aumento no tamanho das plantas.

A Figura 3.3 mostra as imagens de todos os tratamentos após os 75 dias de avaliação do crescimento das plantas do experimento.

Figura 3.3 – Imagens dos tratamentos após 75 dias de avaliação do experimento.



Legenda: Imagem A: indica de forma horizontal os tratamentos com adubação, mas sem adição de Nitrogênio, da direita para a esquerda: C1 (Controle 1, sem bactéria), T3 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense*), T4 (CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*), T5 (CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*), T6 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*), T7 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*), T8 (CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*) e T9 (Bactérias Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*); imagem B: indica os tratamentos com adubação + 50% de Nitrogênio, da esquerda para a direita, C2 (Controle 2, sem bactéria), T10 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense*), T11 (CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*), T12 (CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*), T13 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*), T14 (Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*), T15 (CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*) e T16 (Bactérias Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*); imagem C: indica na parte superior os tratamentos, da esquerda para a direita, C1, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9 e na parte inferior, da esquerda para a direita, os

tratamentos C2, T10, T11, T12, T13, T14, T15 e T16; e o item D indica uma visão superior da parte aérea e das raízes dos tratamentos seguindo a mesma ordem da imagem C.

Fonte: ANDRADE, 2017.

Na Tabela 3.2 indica os parâmetros de matéria seca da parte aérea e raiz, sendo que houve diferença significativa pelo teste de média de Scott Knott ($p < 0,05$) para as bactérias e para a interação bactéria-nitrogênio, então foi realizado o desdobramento da interação.

Na ausência de nitrogênio a matéria seca da parte aérea variou de 7,83 g a 14,64 g, com maior valor para a inoculação da combinação de Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* com 14,64 g. Já para adubação com 50% de nitrogênio variou de 9,57 g e 21,44 g, sendo o maior valor para a combinação das três bactérias juntas Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* com 21,44g. As outras combinações das bactérias, as sozinhas e a ausência 'SEM' não difere estatisticamente.

Na ausência de nitrogênio a matéria seca da raiz variou de 3,15 g a 10,00 g, sendo o maior valor foi a inoculação da bactéria Ab-V5 *Azospirillum brasilense* com 10,00 g e na ausência de bactéria 'SEM' teve média de 4,50 g. Com a adubação de 50% de nitrogênio variou de 4,17 g a 12,41 g, sendo que o maior valor foi a combinação das bactérias Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* com 12,41 g, e na ausência de bactéria 'SEM' foi de 9,85 g.

Ainda de acordo com os resultados da tabela 3.2 no desdobramento do nitrogênio dentro de cada nível de bactéria, de modo geral a adubação com 50% de nitrogênio foi melhor para a cultura do morango, houve acréscimos significativos tanto para a matéria seca da parte aérea, quanto para a matéria seca da raiz. Em destaque a inoculação com as três bactérias juntas Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* + adubação com 50% de nitrogênio, a matéria seca da parte aérea aumentou de 11,27 g para 21,44 g e para matéria seca da raiz aumentou de 4,71 g para 10,51 g.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Gírio et al. (2015) para a cana de açúcar, verificaram efeito benefício na inoculação de diferentes bactérias + adubação com nitrogênio; constatou-se que quando o inoculante esteve associado à fertilização nitrogenada, houve acréscimos significativos em relação ao controle não inoculado e sem adição de nitrogênio. Foram observados ganhos de 12, 23, 15, 30, 17, 30 e 14%, respectivamente, para

número de perfilhos, somatória das alturas e dos diâmetros, comprimento de raízes, matéria seca da parte aérea como palhas e colmos, matéria seca da raiz e matéria seca total.

Tabela 3.2 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango

	Matéria Seca Parte Aérea (g)	Matéria Seca Parte Aérea (g)	Matéria Seca Raiz (g)	Matéria Seca Raiz (g)
Bactérias	0% N	50% N	0% N	50% N
Ab-V5	12,54 aA*	9,57 bA	10,00 aA*	4,50 bB
CCMA 0056	7,83 bB	11,19 bA	3,15 cA	4,17 bA
CCMA 1285	10,23 bA	10,43 bA	7,34 bB	10,06 aA
Ab-V5 + CCMA 0056	14,64 aA	10,86 bB	6,61 bA	4,90 bA
Ab-V5 + CCMA 1285	9,02 bA	12,04 bA	6,44 bB	12,41 aA
CCMA 0056 + CCMA 1285	10,17 bB	13,48 bA	4,30 cB	10,12 aA
Ab-V5 + CCMA 0056 + CCMA 1285	11,27 aB	21,44 aA	4,71 cB	10,51 aA
SEM	8,03 bB	13,96 bA	4,50 cB	9,85 aA
CV (%)	16,09	16,09	18,4	18,4

Legenda: Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, SEM (sem bactéria). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre linhas e minúscula entre colunas não se diferem entre si pelo teste de Scott Knott. A 5% de probabilidade.

Fonte: ANDRADE, 2017.

A Tabela 3.3 indica os parâmetros de matéria seca total, sendo que houve diferença significativa pelo teste de média de Scott Knott ($p < 0,05$) para as bactérias e para a interação bactéria-nitrogênio. Por isso, foi realizado o desdobramento da interação.

Na ausência de nitrogênio variou de 10,99 g a 22,55 g, sendo que em destaque foi a bactéria Ab-V5 *Azospirillum brasilense* com 22,55g, seguida da combinação Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* com 21,25 g e a ausência de bactéria ‘SEM’ teve um valor de 12,54g. Com a adubação de 50% de nitrogênio variou de 14,42 g a 31,95 g, sendo que o maior valor foi a combinação das três bactérias juntas Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* com 31,95g e na ausência de bactérias ‘SEM’ teve um valor de 23,81.

Ainda de acordo com a tabela 3.3 no desdobramento do nitrogênio dentro de cada nível de bactéria, constatou-se que, quando o inoculante teve associado a adubação com 50% de nitrogênio, de modo geral, houve acréscimos significativos para matéria seca total. Cada bactéria e suas combinações responderam de forma diferente a adição do nitrogênio, mas em destaque foi a inoculação das três bactérias juntas Ab-V5 *Azospirillum brasilense* + CCMA

0056 *Burkholderia cepacia* + CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* + adubação com 50% de nitrogênio com aumento de 15,99 g para 31,95 g.

Tabela 3.3 – Parâmetros avaliados do crescimento do morango

Matéria Seca Total (g)		
Bactérias	0% N	50% N
Ab-V5	22,55 aA*	14,07 dB
CCMA 0056	10,99 cB	15,36 dA
CCMA 1285	17,57 bA	20,49 cA
Ab-V5 + CCMA 0056	21,25 aA	15,77 dB
Ab-V5 + CCMA 1285	15,46 bB	24,45 bA
CCMA 0056 + CCMA 1285	14,47 bB	23,61 bA
Ab-V5 + CCMA 0056 + CCMA 1285	15,99 bB	31,95 aA
SEM	12,54 cB	23,81 dA
CV (%)	13,15	

Legenda: Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, SEM (sem bactéria). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre linhas e minúscula entre colunas não se diferem entre si pelo teste de Scott Knott. A 5% de probabilidade.

Fonte: ANDRADE, 2017.

Nesse experimento, a adição das bactérias teve o diferencial, principalmente a co-inoculação, igualmente em trabalhos de Botta et al. (2013) com inoculação de quatro bactérias diferentes (*Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia ambifaria*) em tomates e suas combinações. Houve uma resposta positiva em comparação com os controles não inoculados como maior comprimento da raiz, aumento do número de raízes laterais, aumento do número de folhas e parte aérea e matéria seca. A coinoculação frequentemente aumenta o crescimento e o rendimento, em comparação com a inoculação única, o que proporciona às plantas uma nutrição mais equilibrada, aumenta a disponibilidade de minerais e nutrientes e melhora a economia de nitrogênio e fósforo.

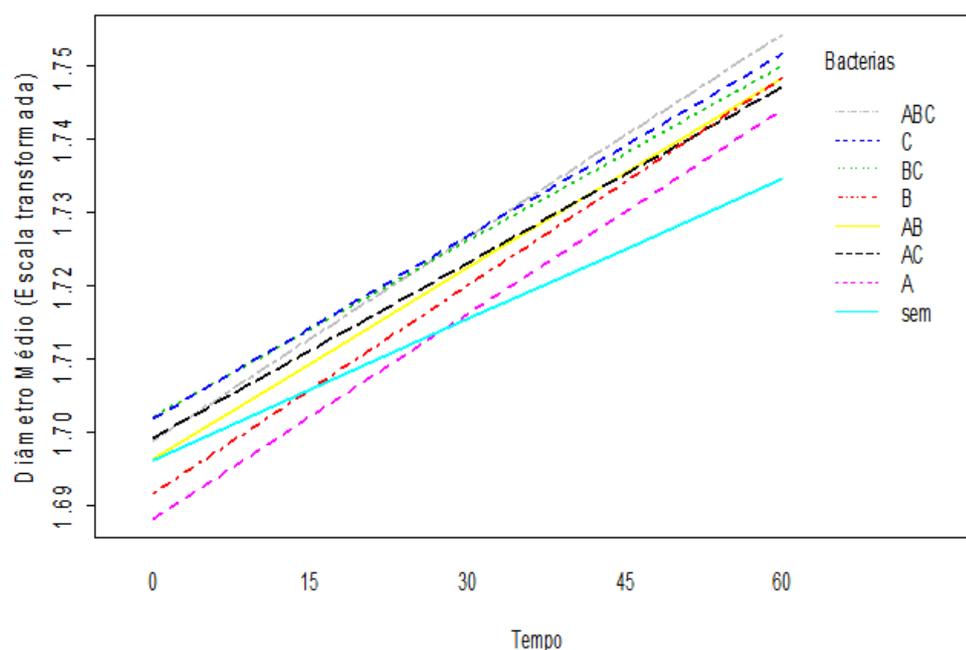
Segundo Pereira et al. (2012) em trabalhos com inoculação de bactérias em morango, o gênero *B. subtilis* e *Enterobacter* sp., o peso seco da parte aérea aumentou estatisticamente em comparação com as plantas controle. Ainda com relação à cultura de morango, foi relatado o uso de diferentes microorganismos benéficos, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Azospirillum*, indicando que foram capazes de aumentar a produção de biomassa vegetal e frutas (ESITKEN et al., 2010; ERTURK et al., 2012; SALAZAR et al., 2012). Várias espécies de *Burkholderia* foram relatadas por seus efeitos benéficos, como o aumento

biomassa na cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006) e produção de grãos em milho e arroz (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010; ESTRADA et al., 2013).

Em relação à análise da variável diâmetro médio de coroa das plantas ao longo do tempo de inoculação (medido nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 dias de inoculação) Nesse caso, para o diâmetro de coroa foram significativos os fatores bactérias e nitrogênio. Na Figura 3.5 tem-se o gráfico do comportamento do fator bactéria ao longo do tempo elaborado pelo programa *software* R. Podemos verificar um aumento no diâmetro ao longo do tempo das inoculações, sendo o de modo geral todos os tratamentos inoculados tiveram um diâmetro médio maior do que o controle (SEM), mas o tratamento inoculado com a bactéria ABC se destacou em relação ao controle (SEM) e aos outros tratamentos.

Embora a inoculação bacteriana nem sempre resulte em resultados positivos mensuráveis, é esperado que tais plantas inoculadas possam exibir uma resistência melhor ao estresse ambiental após o plantio externo e subsequente crescimento a campo como sugerido por Vestberg et al. (2004). Os resultados mostraram que a resposta a inoculação é bastante variável e parece ser dependente de vários fatores incluindo o genótipo da planta e o ambiente, favorável ao crescimento bacteriano, incluindo vários fatores, como a disponibilidade de umidade e nutrientes (BALDOTTO et al., 2012).

Figura 3.4 – Diâmetro médio das plantas ao longo do tempo de inoculação (Bactéria x Tempo)



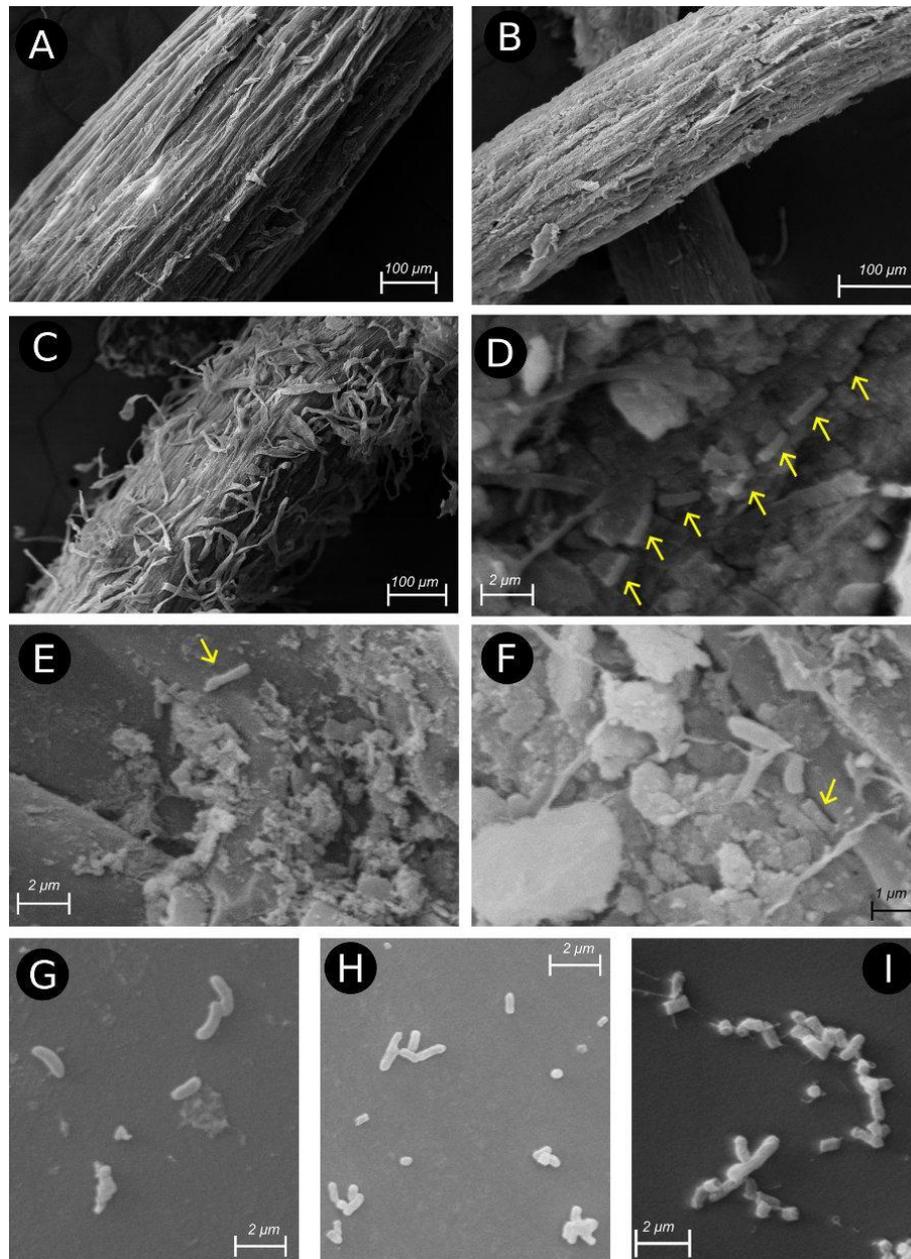
Fonte: *Software R*, 2017.

3.3 Análise da ultra estrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 3.5 apresenta as raízes do morango, as bactérias e a formação de pêlos capilares nos tratamentos e controle. De modo geral todas as plantas inoculadas do experimento mostraram diferentes graus de colonização bacteriana na superfície radicular com áreas com baixa densidade de bactérias associadas aleatoriamente ou dispersas, zonas com agregados bacterianos (figuras D; E e F).

Observa-se que, de modo geral, os controles mostraram menor proliferação de pêlos radiculares, enquanto as plantas inoculadas apresentaram um importante desenvolvimento desses pêlos (figura A, B e C), como relatado em outros trabalhos (PEDRAZA et al., 2010; GUERRERO-MOLINA et al., 2012) que mostram as diferenças na proliferação de pêlos da raiz observadas entre as plantas inoculadas com *Azospirillum* e o controle. Os pêlos radiculares são importantes, pois aumentam o volume de substrato de solo a ser explorado, além de absorver mais água, nutrientes e outros processos, devido à área de superfície da raiz aumentada, auxiliando no maior desenvolvimento da planta (REIS JUNIOR et al.; 2008; HUNGRIA et al. 2010; VOGEL et al., 2013). As figuras G, H e I apresentam respectivamente as bactérias inoculadas Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, mostrando apenas as colônias puras em meio líquido, para a verificação das características microscópicas.

Figura 3.5 – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura das raízes de morango inoculado e não inoculado



Legenda: Figura (A) Controle 1; figura (B) Controle 2; figura (C) Tratamento 8; figura (D) Tratamento 12; figura (E) Tratamento 15; figura (F) Tratamento 14; figura (G) bactéria Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, figura (H) CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, figura (I) CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*.

Fonte: ANDRADE, 2017.

3.4 Isolamento das bactérias endofíticas

No total foram 180 bactérias endofíticas foram isoladas das folhas e raízes de morango. Conforme suas características macro e microscopias e também coloração de Gram. Desse total de bactérias, 70 foram isoladas da folha e 110 foram da raiz.

As bactérias endofíticas foram localizadas principalmente nas raízes, apresentando gradiente decrescente das raízes às folhas. Além disso, pode-se sugerir que a principal região de entrada dos endófitos sejam as raízes para, então disseminar no interior da planta (SILVA et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados nas culturas de cana-de-açúcar, soja, arroz, milho, tomate em outras cultivares (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014; RODRIGUES et al, 2016b). Os microorganismos encontrados em cada parte das plantas são altamente específicos e algumas espécies são capazes de colonizar regiões diferentes simultaneamente (GLICK 2012).

Na Tabela 3.4 mostra os isolados que foram realizada a identificação, o número do score obtidos pelo MALDI-TOF, a região (folha ou raiz) que foi isolada e a população bacteriana por morfotipos.

Tabela 3.4 – Identificação das bactérias isoladas das raízes e folhas do morango

Identificação	Tratamento	Gram	Score	Isolada	População
<i>Bacillus subtilis</i>	T4	+	1.905	Raiz	4 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T10	+	1.951	Raiz	3 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T8	+	1.72	Raiz	4 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T4	+	2.048	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T4	+	1.73	Raiz	1 x 10 ⁴
<i>Bacillus subtilis</i>	T3	+	2.056	Raiz	4 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	C1	+	1.895	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T3	+	1.733	Raiz	5 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T6	+	1.759	Raiz	2 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T14	+	1.933	Raiz	3 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T5	+	1.751	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T5	+	1.786	Raiz	2 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T8	+	1.847	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T6	+	1.752	Folha	1 x 10 ³
<i>Bacillus subtilis</i>	T10	+	1.971	Folha	1 x 10 ⁵

Tabela 3.4 – Identificação das bactérias isoladas das raízes e folhas do morango “continua”

Identificação	Tratamento	Gram	Score	Isolada	População
<i>Bacillus subtilis</i>	T6	+	1.904	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	C1	+	1.778	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus subtilis</i>	T15	+	1.297	Raiz	4 x 10 ⁴
<i>Bacillus shackletonii</i>	T6	+	1.867	Raiz	3 x 10 ³
<i>Bacillus cereus</i>	T8	+	1.702	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Bacillus megaterium</i>	T14	+	1.857	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Pantoea ananatis</i>	T6	-	1.605	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T11	-	2.077	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T12	-	2.207	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T6	-	2.008	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T16	-	2.172	Folha	1 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T5	-	2.039	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T4	-	1.851	Folha	1 x 10 ⁴
<i>Pantoea ananatis</i>	T16	-	1.998	Folha	2,64 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T10	-	2.082	Raiz	3 x 10 ⁵
<i>Pantoea ananatis</i>	T3	-	1.944	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T6	-	1.888	Raiz	5 x 10 ⁵
<i>Pantoea ananatis</i>	T15	-	2.016	Folha	1 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T13	-	1.993	Folha	3 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	T12	-	1.934	Folha	2 x 10 ³
<i>Pantoea ananatis</i>	C2	-	1.727	Folha	1 x 10 ³
<i>Paenibacillus cineris</i>	T8	+	1.893	Folha	1 x 10 ³
<i>Paenibacillus favisporus</i>	T15	+	1.368	Raiz	3 x 10 ⁴
<i>Paenibacillus favisporus</i>	T7	+	2.022	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Paenibacillus favisporus</i>	T8	+	1.856	Folha	1 x 10 ³
<i>Acinetobacter ursingii</i>	T7	-	1.886	Folha	1 x 10 ³
<i>Acinetobacter ursingii</i>	T10	-	1.97	Folha	1 x 10 ⁴
<i>Acinetobacter ursingii</i>	T10	-	2.123	Raiz	1 x 10 ⁴
<i>Acinetobacter pittii</i>	T12	-	2.177	Folha	1,41 x 10 ³
<i>Micrococcus luteus</i>	T7	+	1.795	Raiz	1 x 10 ⁴
<i>Micrococcus luteus</i>	T8	+	1.989	Folha	1 x 10 ³
<i>Micrococcus luteus</i>	T10	+	1.99	Folha	2 x 10 ³
<i>Brevebacillus centrosporus</i>	T10	+	1.819	Folha	1 x 10 ³
<i>Brevebacillus centrosporus</i>	T3	+	1.918	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	T8	+	1.959	Folha	1,41 x 10 ³

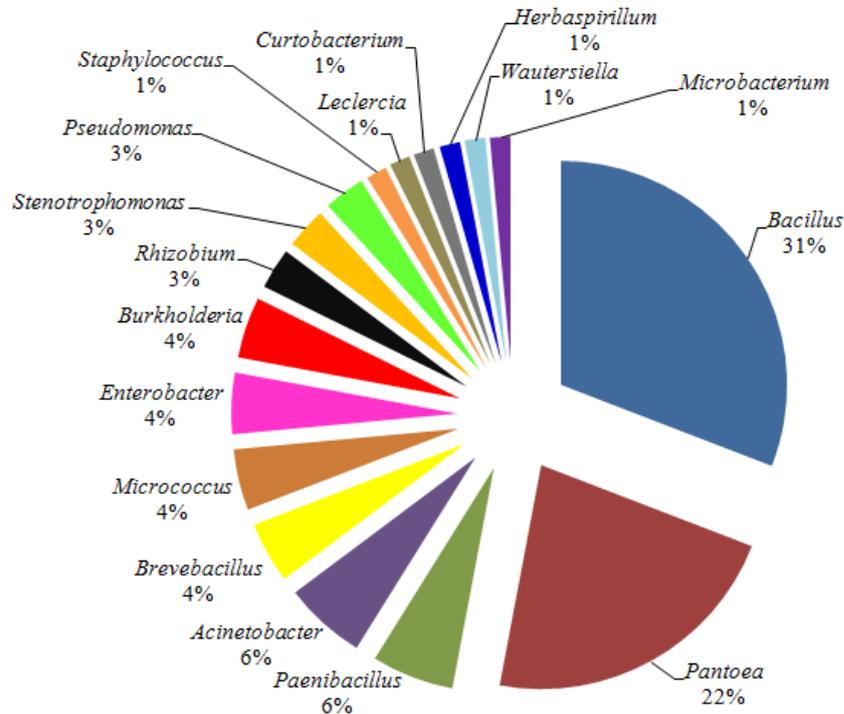
Tabela 3.4 – Identificação das bactérias isoladas das raízes e folhas do morango “conclusão”

Identificação	Tratamento	Gram	Score	Isolada	População
<i>Enterobacter cloacae</i>	T10	-	2.285	Raiz	1,32 x 10 ⁵
<i>Enterobacter cloacae</i>	T7	-	2.157	Raiz	2 x 10 ³
<i>Enterobacter cloacae</i>	T15	-	1.941	Raiz	2 x 10 ⁴
<i>Burkholderia gladioli</i>	T16	-	2.357	Raiz	1 x 10 ⁴
<i>Burkholderia gladioli</i>	T16	-	2.296	Raiz	3 x 10 ⁵
<i>Burkholderia gladioli</i>	T9	-	1.974	Folha	3 x 10 ³
<i>Rhizobium radiobacter</i>	T3	-	2.059	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Rhizobium radiobacter</i>	C2	-	1.95	Folha	1 x 10 ³
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	T8	-	1.863	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	T13	-	1.916	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Pseudomonas putida</i>	T11	-	1.777	Raiz	2,44 x 10 ⁵
<i>Pseudomonas putida</i>	T13	-	2.134	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Staphylococcus equorum</i>	T6	+	1.729	Raiz	1 x 10 ⁵
<i>Wautersiella falsenii</i>	T4	-	1.969	Raiz	3 x 10 ⁵
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	T15	-	2.465	Raiz	1 x 10 ⁴
<i>Curtobacterium albidum</i>	T5	-	1.901	Folha	4 x 10 ³
<i>Herbaspirillum huttiense</i>	T10	-	1.735	Raiz	3,46 x 10 ⁴
<i>Microbacterium arborescens</i>	T5	+	1.964	Folha	1,41 x 10 ³

Fonte: ANDRADE, 2017.

Dos microrganismos identificados ocorreu um predomínio de bactérias dos gêneros *Bacillus* (31%), *Pantoea* (22%), *Paenibacillus* (6%), *Acinetobacter* (6%), *Enterobacter* (4%), *Acinetobacter* (4%), *Micrococcus* (4%), *Burkholderia* (4%), *Brevibacillus* (4%), *Rhizobium* (3%), *Pseudomonas* (3%), *Stenotrophomonas* (3%) e as demais espécies *Staphylococcus*, *Leclercia*, *Curtobacterium*, *Wautersiella*, *Herbaspirillum* e *Microbacterium* tiveram ocorrência de 1% conforme mostrada na Figura 3.6.

Figura 3.6 – Distribuição percentual de bactérias endofíticas identificadas



Fonte: ANDRADE, 2017.

Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* possuem habitat natural o solo e também os tecidos internos das plantas com uma associação benéfica para a planta, proporciona o aumento fisiológico de metabolitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular, proporcionando a melhor absorção de nutrientes (LIMA et al, 2011). Espécies como *B. subtilis* na promoção de crescimento de plantas, está intrinsecamente relacionada com as características biológicas deste microrganismo, que apresenta facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados (LANNA FILHO et al, 2010).

O gênero *Pantoea* foi encontrado com maior frequência das espécies isoladas, sendo encontrado tanto em folhas como raízes. Esta bactéria também é considerada endofítica, e muito comum encontrada em diversas plantas e também são considerados promotores de crescimento (SILVA et al, 2015). Oliveira et al., 2014 relatou o uso da linhagens de *Pantoea* sp. na produção de insumos agrícolas que promovem crescimento vegetal. Nos estudos de Pereira et al, (2012) com isolamento de frutos de morango, além de *Pantoea punctata*, as espécies *Bacillus* sp. *Curtobacterium citreum*, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. também foram identificadas.

Rhizobium radiobacter foi isolado em pequena proporção como apresentado na Figura 3.6. No entanto, bactérias deste gênero são consideradas promotoras de crescimento devido à

fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, sendo que vivem nas raízes de algumas leguminosas formando uma associação simbiótica com essas plantas. Diversos trabalhos encontraram esse gênero e sendo também usado como inoculantes (HAWERROTH et al., 2011; COSTA et al., 2013).

O gênero *Enterobacter* foi o segundo maior grupo isolado no presente estudo. Espécies deste grupo têm adquirido grande importância por possuírem representantes capazes de fixar nitrogênio, sendo encontrados em várias espécies vegetais, tanto como endofíticos quanto na rizosfera. São consideradas endofíticas verdadeiras e já foram isoladas de diversas plantas, sendo descritas como promotoras de crescimento vegetal (AHEMAD; KHAN 2010; MORALES-GARCIA et al., 2011). Já o gênero *Pseudomonas* é responsável pela produção de alguns compostos com propriedades antifúngicas capaz de interferir diretamente no fator patogenicidade de alguns de fungos, além da produção de auxinas e gibberelinas e solubilização de fosfato (AMBARDAR et al. 2013, ISLAM et al., 2014)

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito por Baldani et al (1986) sendo comumente encontrado em raízes, caule e folhas das plantas, pois apresentam baixa sobrevivência no solo e são considerados promotores de crescimento vegetal. Já foi relatado como de forma benéfica sua inoculação em milho (DARTORA et al, 2013). O gênero *Acinetobacter* também já foi descrito como endofítico promotor de crescimento em trabalhos, segundo Silva et al (2008), foi isolado de folhas e hastes de tomateiro e pimentão promoveu controle da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae*) do tomateiro sendo eficazes na redução da severidade dessa pinta bacteriana.

Diversos autores relatam que as bactérias promotoras de crescimento de plantas colonizam diferentes órgãos e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, promovendo aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas, tanto em casa de vegetação como no campo (SANTOS et al, 2014). Os resultados desse trabalho confirmam que esses os microrganismos endofíticos que foram encontrados são muito comuns na natureza. Na literatura pesquisas com microrganismos endofíticos estão, geralmente, voltadas para aquelas espécies vegetais que possuem valor econômico como milho, soja, cana entre outras (RODRIGUES et al, 2016b; SANTOS et al, 2015).

4. CONCLUSÃO

Esse trabalho foi o primeiro estudo com as bactérias da Coleção CCMA-UFLA na investigação dessas bactérias em relação aos testes promotores de crescimento em plantas (produção de auxina e fixação de nitrogênio) para uma possível utilização desses microrganismos como inoculantes. A cultura do morango respondeu significativamente a inoculação das estirpes *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter cloacae*, sendo que os melhores resultados foram quando teve a inoculação de mais de uma bactéria.

A combinação das três bactérias juntas (*Azospirillum brasilense* + *Burkholderia cepacia* + *Enterobacter cloacae*) com 50% de adubação com nitrogênio se destacou devido a essa interação com todo sistema da planta, ocorrendo assim uma associação positiva dessas bactérias inoculadas. Ou seja, a combinação de bactérias mais adubação com nitrogênio é melhor para a cultura do morango, pois teve aumento dos pesos da parte aérea, raiz e total. Com o isolamento dos microrganismos endofíticos há um melhor conhecimento de quais bactérias habitam as partes do morango e podem contribuir para desenvolvimento da planta, sendo possíveis espécies a serem usadas em outros estudos.

O presente trabalho pretende aumentar esse conhecimento sobre as interações do sistema bactérias-plantas, além disso, desenvolver uma fonte de nutrientes ecológicos para as plantas de morango, de modo a diminuir às práticas agrícolas tradicionais que prejudicam a biodiversidade. Com isso, será possível o uso mais amplo desses microrganismos, que sejam viáveis e com potencial prático de inoculação na agricultura.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. **EurAsian J BioSci**, v. 4, p. 88–95, 2010.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University Science**, Elsevier BV, v. 26, n. 1, p. 1–20, jan 2014.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Elsevier BV, v. 163, n. 2, p. 173–181, mar 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>>.
- AMBARDAR, S.; VAKHLU, J. Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. **World journal of microbiology and biotechnology**, Springer Science & Business Media, v. 29, n. 12, p. 2271, 2013.
- ARAÚJO, F. F. Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. parte ii—microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: _____. **Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 197–210.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Microbiology Society, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, V. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Springer, v. 30, n. 5, p. 485–491, 2000.
- BALDOTTO, M. A. et al. Initial performance of maize in response to npk fertilization combined with *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista Ceres**, SciELO Brasil, v. 59, n. 6, p. 841–849, 2012.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M. d.; POZZA, E. A. Endophytic bacteria as agents of plant growth promotion in tomato and inhibition in vitro of *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, SciELO Brasil, v. 32, n. 3, p. 731–739, 2008.
- BARRIUSO, J. et al. Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Biotechnology Journal**, Wiley-Blackwell, v. 6, n. 5, p. 442–452, apr 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00331.x>>.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, Elsevier, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, dec 2011.

- BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, Springer, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.
- BOTTA, A. L. et al. In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, Elsevier BV, v. 30, n. 6, p. 666–674, sep 2013.
- BOZZOLA J.J.; RUSSELL L., D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Diário Oficial da União**: Instrução normativa no. 30/2010. Brasília.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Diário Oficial da União**: Instrução normativa no. 13/2011. Brasília, 2011.
- COELHO JÚNIOR, J. M. Strawberry cultivars: Knowing to expand and reduce the environmental impacts | cultivares de morango: conhecer para expandir e reduzir os impactos ambientais. **Revista Geama**, v. 5, n. 1, p. 138–147, 2016.
- COELHO JÚNIOR, J. M. Strawberry farming with lichens: an alternative to the environment cultivo de morangos com líquens: uma alternativa para o ambiente. **Revista Geama**, v. 5, n. 1, p. 123–137, 2016.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Wiley Online Library, v. 5, n. 9, p. 719–729, 2003.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669 – 678, 2010. ISSN 0038-0717. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071709004398>>.
- COSTA, E. M. d. et al. Plant growth promotion and genetic diversity of bacteria isolated from cowpea nodules. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, SciELO Brasil, v. 48, n. 9, p. 1275–1284, 2013.
- DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. d.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em lavras, mg. **Ciência e Agrotecnologia**, Editora da Universidade Federal de Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862–1866, 2007.
- DARTORA, J. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental - Agriambi**, v. 17, n. 10, 2013.
- DEEPA, C. K.; DASTAGER, S. G.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (l.) walp.) seedling growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 26, n. 7, p. 1233–1240, 2010.

DIAS, A. C. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 25, n. 2, p. 189–195, 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, Taylor & Francis, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA Solos, 2006.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; CAKMAKCI, R. Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. **Journal of Plant Nutrition**, Informa UK Limited, v. 35, n. 6, p. 817–826, apr 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663437>>.

ESITKEN, A. et al. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, Elsevier BV, v. 124, n. 1, p. 62–66, feb 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>>.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. et al. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Annals of Microbiology**, Springer Nature, v. 66, n. 3, p. 1303–1314, dec 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13213-015-1183-1>>.

ESTRADA, G. A. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Springer Science & Business Media, v. 369, n. 12, p. 115, 2013.

FAOSTAT. 2014. Acessado em 07 jun 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>.

FERRARA, F. I. de S. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, Springer, v. 353, n. 1, p. 409–417, 2012.

FIPKE, G. M. et al. Co-inoculation with diazotrophic bacteria in soybeans associated to urea topdressing. **Ciência e Agrotecnologia**, FapUNIFESP (SciELO), v. 40, n. 5, p. 522–533, oct 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1413-70542016405001316>>.

FLORENTINO, L. A. et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 89–96, 2017.

FRANKENBERGER JUNIOR, W. T.; MUHAMMAD, A. **Phytohormones in soils: microbial production and function**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995.

GEORGE, P. et al. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* kisii and *Enterobacter* sp. rnf 267 isolated from the rhizosphere of

coconut palms (*Cocos nucifera* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, p. 1–9, 2013.

GIRIO, L. A. d. S. et al. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v. 50, n. 1, p. 33–43, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, Am Soc Plant Biol, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1951.

GOSAL, S. K. et al. Assessing the benefits of *Azotobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. **Sugar Tech**, Springer, v. 14, n. 1, p. 61–67, 2012.

GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, Elsevier BV, v. 61, p. 205–212, oct 2012.

HARI, K.; SRINIVASAN, T. R. Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. **Sugar Tech**, Springer Nature, v. 7, n. 23, p. 28–31, jun 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/bf02942525>>.

HAWERROTH, F. J.; CRESTANI, M.; SANTOS, J. C. P. Common bean cultivars performance under *Rhizobium* inoculation and the relation between yield components traits. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 897–908, 2011.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). **Plant Growth Regulation**, Springer, v. 60, n. 3, p. 191–197, 2010.

HOSSAIN, M. M. et al. Isolation and identification of *Azospirillum* isolates from different paddy fields of north bengal. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology**, Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, v. 3, n. 1, p. 74, 2015.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Springer, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

ISLAM, F. et al. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as pgpr on oxidative stress tolerance in wheat under zn stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, Elsevier, v. 104, p. 285–293, 2014.

JHA, C. K.; PATEL, B.; SARAF, M. Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* msa2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 28, n. 3, p. 891–899, 2012.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969–976, 1970.

KANNAN, T.; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasilense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, 2010.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Wiley Online Library, v. 96, n. 3, p. 473–480, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Wiley-Blackwell, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, dec 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>>.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.

LACAVALA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect pest and diseases by endophytes. In: _____. **Advances in Endophytic Research**. New Delhi, Springer India, p. 231–256, 2014.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por bacillus subtilis. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

LIMA, A. S. T. d. et al. Synergism of *Bacillus*, *Brevibacillus* and/or *Paenibacillus* in the symbiosis of *Bradyrhizobium cowpea*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, SciELO Brasil, v. 35, n. 3, p. 713–721, 2011.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore producing bacteria in rice. **Microbial ecology**, Springer, v. 61, n. 3, p. 606–618, 2011.

LOVAISA, N. C. et al. Respuesta de plantas de frutilla inoculadas con *Azospirillum* y *Burkholderia* en condiciones de campo. **Revista agronómica del noroeste argentino**, SciELO Argentina, v. 35, n. 1, p. 33–36, 2015.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, jul 2010.

MORALES-GARCÍA, Y. E. et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. **Revista Argentina de Microbiología**, SciELO Argentina, v. 43, n. 4, p. 287–293, 2011.

MORILLO, J. G. et al. Toward precision irrigation for intensive strawberry cultivation. **Agricultural Water Management**, Elsevier BV, v. 151, p. 43–51, mar 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.09.021>>.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011.

OLIVEIRA, A. L. M. de et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Springer, v. 284, n. 1, p. 23–32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. de et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56–77, 2014.

OLIVEIRA, M. A. d. et al. Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agrônomico do milho. **Revista de Ciências Agrárias**, Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal, v. 38, p. 18 – 25, 03 2015. ISSN 0871-018X.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Nature, v. 26, n. 2, p. 265–272, sep 2009.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 26, n. 2, p. 265–272, 2010.

PEDRAZA, R. O. et al. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and soil**, Springer, v. 295, n. 1, p. 169–178, 2007.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Instituto Agrônomico de Campinas, v. 69, n. 4, 2010.

PEREIRA, G. V. de M. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 405–417, 2012. ISSN 1432-184X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9919-3>>.

PERES, A. R. et al. Co-inoculation of rhizobium tropici and azospirillum brasilense in common beans grown under two irrigation depths. **Revista Ceres**, FapUNIFESP (SciELO), v. 63, n. 2, p. 198–207, apr 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0034-737x201663020011>>.

PONCE, A. dos R. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SciELO Brasil, v. 30, n. 1, 2010.

QUECINE, M. C.; BATISTA, B. D.; LACAVALA, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. In: _____. **Biotechnology**. Houston: publisher, (Plant Biotechnology, v. 2), cap. 16, p.377–423, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RADIN, B. et al. Desempenho de quatro cultivares de morangueiro em duas regiões ecoclimáticas do rio grande do sul. **Horticultura Brasileira**, SciELO Brasil, v. 29, n. 3, p. 287–291, 2011.

RAMESH, A. et al. Plant growth-promoting traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* mdsr9 isolated from soybean rhizosphere and its impact on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation. **Agricultural research**, Springer, v. 3, n. 1, p. 53–66, 2014.

REIS JUNIOR, F. B. d. et al. Inoculation of *Azospirillum amazonense* in two maize genotypes under different n treatments. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, SciELO Brasil, v. 32, n. 3, p. 1139–1146, 2008.

REIS JUNIOR, F. B. dos et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, FapUNIFESP (SciELO), v. 32, n. 3, p. 1139–1146, jun 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-06832008000300022>>.

RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, SciELO Brasil, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.

SALAZAR, S. et al. Fruit yield of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense* rlc1 and rec3 under field conditions. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 32, n. 12, p. 63–66, 2012.

SANTOS, J. d. S. et al. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in vitória da conquista, bahia, brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, SciELO Brasil, v. 39, n. 1, p. 78–85, 2015.

SANTOS, J. F. dos et al. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 2, n. 1, p. 10–1590, 2014.

SILVA, J. F. da et al. Isolation of *Pantoea ananatis* from sugarcane and characterization of its potential for plant growth promotion. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15301–15311, 2015.

SILVA, J. R. C. et al. Control with endophytic bacteria and in vitro inhibition of *Pseudomonas syringae* pv tomato, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia**, SciELO Brasil, v. 32, n. 4, p. 1062–1072, 2008.

SILVA, M. de O. et al. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 4, 2012.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fzb42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 26 – 33, 03 2015. ISSN 0871-018X.

VAN, V. T. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of vietnam. **Plant and Soil**, Springer, v. 218, n. 1, p. 273–284, 2000.

VANLAERE, E. et al. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Microbiology Society, v. 58, n. 7, p. 1580–1590, 2008.

VESSEY, J. K. **Plant and Soil**, Springer Nature, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VESTBERG, M. et al. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. **Applied Soil Ecology**, Elsevier, v. 27, n. 3, p. 243–258, 2004.

VOGEL, G. F. et al. Agronomic performance of *Azospirillum brasilense* on wheat crops. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 6, n. 3, p. 111–119, 2014.

ZAHARAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of biotechnology**, Elsevier, v. 91, n. 2, p. 143–153, 2001.

ZHAO, K. et al. Maize rhizosphere in sichuan, china, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological research**, Elsevier, v. 169, n. 1, p. 76–82, 2014.