



PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS DE RAÍZES DE ALHO E CARACTERIZAÇÃO
DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MERISTEMAS
MICROPROPAGADOS**

**LAVRAS – MG
2018**

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAÍZES
DE ALHO E CARACTERIZAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM
MERISTEMAS MICROPROPAGADOS**

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

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

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

Costa Júnior, Paulo Sérgio Pedroso.
Isolamento e Identificação de Bactérias Endofíticas de Raízes de
Alho e Caracterização da Promoção de Crescimento em Meristemas
Micropropagados / Paulo Sérgio Pedroso Costa Júnior. - 2018.
80 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues Soares.
Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. Raiz. 2. Bactérias Endofíticas. 3. Fitormônio. I. Soares,
Joyce Dória Rodrigues. II. Schwan, Rosane Freitas. III. Título.

PAULO SÉRGIO PEDROSO COSTA JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAÍZES
DE ALHO E CARACTERIZAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM
MERISTEMAS MICROPROPAGADOS**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOFITIC BACTERIA FROM GARLIC
ROOTS AND CHARACTERIZATION OF THEIR GROWTH PROMOTION IN
MICROPROPAGATED MERISTEMS**

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

APROVADO em 31 de julho de 2018.

Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares UFLA

Dr. Adalvan Daniel Martins UFLA

Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada UEM

Prof.^a Joyce Dória Rodrigues Soares
Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

*Aos meus pais Sérgio e Luisa pelo exemplo de força e incentivo constante;
Aos meus irmãos Paula e Lucas por todo carinho e palavras de conforto quando mais
precisei.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida. A Ti toda honra e glória.

A minha mãe, Luisa Dias, pelo amor incondicional, cuidado e estímulo aos estudos.

Ao meu pai, Paulo Sérgio, por todo ensinamento, dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, Ana Paula e Lucas, por sempre estarem na minha torcida.

A minha avó, Maria Santiago (*in memoriam*), que mesmo de longe me guarda e me abençoa.

A toda minha família, em especial a Murilo, Tereza e Luciano, que tem sido a minha base de confiança, respeito e simplicidade.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA pela oportunidade de realização do Curso.

A professora Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares pela orientação, paciência e ensinamentos.

Aos co-orientadores Dra. Rosane Freitas Schwan e Dr. Disney Ribeiro Dias, pela confiança, apoio e oportunidades oferecidas.

Ao Dr. Adalvan Daniel Martins, pela ajuda com a estatística do trabalho.

Ao Felipe e Vytória, pela ajuda na realização dos experimentos, em especial nessa reta final.

A todos os professores e profissionais do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos valiosos ensinamentos, em especial à Rose, secretária do PPGMA, e pós-docs Angélica, Gabriela e Kelly.

A equipe do Laboratório de Fermentações e Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial aos técnicos Cidinha, Ivani e Vantuil, sempre dispostos a ajudar, com todo cuidado e paciência.

Aos colegas do PPGMA, em especial à Ana Cláudia, Jéssica, Luara e Maysa, pelo carinho, ajuda na execução do trabalho e companheirismo, indispensáveis durante este percurso.

Ao Núcleo de Estudos em Fermentações, no qual tive a oportunidade de aprender cada vez mais sobre o mundo dos microrganismos.

Aos amigos que mesmo na distância se fizeram presentes, Erika, Jiscele, Leandro e Ruanna.

A todos os amigos que conquistei durante minha estadia em Lavras, em especial à Diogo, Gabriel Domingues, Gabriel Rosa, Harryson, Wesley, e aos agregados Bruno, Laura e Marcos; vocês foram o melhor presente que a UFLA me deu.

À CAPES pelo suporte financeiro.

E àqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigado!

RESUMO

Devido à preocupação em promover uma agricultura sustentável, a implantação de tecnologias com sistemas de produção agrícola mais eficientes tem aumentado, com enfoques ecológicos e com uso responsável dos recursos naturais. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo. O alho (*Allium sativum* L.) é uma das culturas cuja importância econômica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos no Brasil, sendo uma fonte de renda para pequenos e grandes produtores. Porém, o alho precisa estar isento de viroses para o seu cultivo, fator preponderante para o sucesso de sua produção. Portanto, o uso de BPCP mostra-se uma alternativa eficaz na diminuição de custos com insumos agrícolas e no consequente aumento da produtividade. Diante disto, o objetivo principal deste projeto foi isolar e avaliar o potencial promotor de crescimento em plantas de bactérias endofíticas de raiz de alho e bactérias da coleção CCMA (Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola – UFLA), além de verificar as melhorias dos atributos fitotécnicos, nutricionais e fisiológicos de meristemas de alho cultivados em cultura de tecidos sob ação de bactérias promotoras de crescimento em plantas. Foram identificadas 48 bactérias endofíticas pela técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) a partir do perfil proteico de cada isolado. Quatro bactérias foram selecionadas de acordo com sua capacidade de produzir auxina, fixar nitrogênio biológico e solubilizar fosfato, sendo estabelecido o cultivo de meristemas de alho em cultura de tecidos inoculadas com estas bactérias numa população de 10^6 UFC/mL. Também foi avaliada a capacidade de colonização das bactérias no interior das plantas de alho através de microscopia eletrônica de varredura e as características fitotécnicas, anatômicas e teores de clorofila das plantas de alho *in vitro* após a inoculação de BPCP. Com este estudo, pôde-se obter melhoria das características fitotécnicas, nutricionais e fisiológicas do alho a partir da inoculação das BPCP *in vitro*. Os isolados M19B e CCMA 0056 destacam-se como candidatos para aplicação na promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chaves: Raiz; Bactérias Endofíticas; Fitormônio; MALDI-TOF MS; *Azospirillum brasilense*.

ABSTRACT

Due to the concern to promote a sustainable agriculture, the implantation of technologies with more efficient systems of agricultural production has increased, with ecological approaches and with responsible use of the natural resources. Plant growth promoting bacteria (PGPB) are one of the potential alternatives to achieve this goal. Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the crops whose economic importance has increased considerably in recent years in Brazil, being a source of income for small and large formers. However, garlic needs to be free of viruses for its cultivation, a preponderant factor for the success of its production. Therefore, the use of PGPB is an efficient alternative in reducing costs with agricultural inputs and increases productivity. Thus, the aim of this study was to isolate and evaluate the potential growth promoter of endophytic bacteria of garlic root and bacteria from the Collection of Cultures of Agricultural Microbiology (CCMA – UFLA). In addition, to verify the improvements of the phytotechnical, nutritional and physiological attributes of garlic meristem cultivated in tissue culture under the action of PGPB. Forty-eight endophytic bacteria were identified by the mass spectrometry technique (MALDI-TOF MS) according to its protein profile of each isolate. Four bacteria were selected according to their capacity to produce auxin, to fix biological nitrogen and to solubilize phosphate, and the cultivation of garlic meristem in tissue culture inoculated with these bacteria was established in a population of 10^6 CFU / mL. The capacity of colonization of the bacteria inside garlic plants by scanning electron microscopy and the phytotechnical, anatomical and chlorophyll content of garlic plants in vitro after inoculation of PGPB were also evaluated. With this study, it was possible to improve the phytotechnical, nutritional and physiological characteristics of the garlic from the inoculation of PGPB in vitro. M19B and CCMA 0056 stand out as candidates for application in promoting plant growth.

Keywords: Root; Endophytic Bacteria; Fitormônio; *Azospirillum brasilense*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Curva padrão da produção de auxina	40
Figura 2 – Dendrograma do agrupamento hierárquico de bactérias endofíticas identificadas pela técnica MALDI-TOF MS	43
Figura 3 – Número de bactérias endofíticas identificadas pela técnica MALDI-TOF MS	44

CAPÍTULO 3

Figure 1 – Garlic seedlings after 30 days of inoculation with plant growth promoting bacteria.	63
Figure 2 – Length (mm) of garlic seedlings inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture	64
Figure 3 – Fresh (g) mass of garlic seedlings inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture	64
Figura 4 – Frontal views of transverse anatomical sections of garlic leaves inoculated with PGPB after 30 days of in vitro culture	65
Figure 5 – Thickness of the epidermis of garlic leaves as a function of the inoculation of plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.....	66
Figure 6 – Garlic leaf limb thickness (mm) as a function of inoculation of plant growth promoting bacteria after 30 days of culture in vitro	66
Figure 7 – Chlorophyll a content in garlic plant inoculated with different plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture	67
Figure 8 – Carotenoid content in garlic plant inoculated with different plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.....	68
Figure 9 – Electronic micrograph of garlic bulbs inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.....	69
Figure 10 – Comparison of garlic plant development contaminated with filamentous fungi after 30 days of in vitro culture	70
Figure 11 – Electron micrograph of garlic plants contaminated with filamentous fungi after 30 days of in vitro culture.....	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento.....	39
Tabela 2 – Caracterização do morfotipo das colônias bacterianas isoladas da raiz de alho.....	41
Tabela 3 – Identificação das bactérias isoladas das raízes de alho.....	44
Tabela 4 – Produção de auxina e fixação de nitrogênio por bactérias isoladas da raiz de alho	46
Tabela 5 – Índice de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados da raiz do alho.....	48

CAPÍTULO 3

Table 1 – Strains belonging to the CCMA used.....	59
Table 2 – Identification by MALDI-TOF MS of the isolates inoculated into the plants after 30 days of in vitro culture.....	68

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Alho - <i>Allium sativum</i> L	12
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	14
2.3	Uso de Fertilizantes e Seus Riscos	16
2.4	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas	18
2.5	Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal	20
2.5.1	Fixação Biológica de Nitrogênio	21
2.5.2	Produção de Auxinas	23
2.5.3	Solubilização de Fosfato	24
2.6	Identificação de Microrganismos por MALDI-TOF MS	25
	REFERÊNCIAS	28

	CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAIZ DE ALHO (<i>Allium sativum</i> L.) E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM PLANTAS	35
1	INTRODUÇÃO	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Isolamento de Bactérias da Raiz de Alho	37
2.2	Testes Fisiológicos, Bioquímicos e Identificação por MALDI-TOF MS	38
2.3	Avaliação da Capacidade de Fixação de Nitrogênio Atmosférico, Produção de Auxina e Solubilização de Fosfato	39
2.3.1	Fixação Biológica de Nitrogênio	39
2.3.2	Produção de Auxina (AIA)	39
2.3.3	Solubilização de Fosfato	40
2.4	Análises Estatísticas	41
3	RESULTADOS	41
4	DISCUSSÃO	48
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

CAPÍTULO 3 – ENDOFYTIC BACTERIA AS GROWTH PROMOTERS OF GARLIC	
(<i>Allium sativum</i> L.) MERISTEM IN VITRO CULTIVATION 57	
1	INTRODUCTION 58
2	MATERIAL AND METHODS 59
2.1	Microorganisms 59
2.2	Growth Curve and Standardization of Inoculum..... 59
2.3	In vitro Meristem Production and Culture 60
2.4	Phytotechnical Characterization 61
2.5	Host Colonization 61
2.6	Contents of Photosynthetic Pigments 61
2.7	Foliate Anatomy 62
2.8	Scanning Electron Microscopy 62
2.9	Statistical Analyzes 63
3	RESULTS..... 63
4	DISCUSSION 71
5	CONCLUSION 74
	REFERENCES 76

1. INTRODUÇÃO GERAL

A demanda de tecnologias e alternativas para melhorar o cultivo 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 plantação 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, em especial, danos às comunidades que habitam o solo, como os microrganismos (GARCIA et al., 2015).

O alho (*Allium sativum* L.) é um dos vegetais mais importantes em todo o mundo. Comumente usados para fins culinários, esta planta também é consumida devido às suas propriedades terapêuticas e medicinais (LANZOTTI et al., 2014). O modo de propagação vegetativa facilita a disseminação de vírus, influenciando o rendimento da cultura a partir do acúmulo de viroses, reduzindo consideravelmente a produção da cultura.

Muitas viroses são intensificadas e perpetuadas por sucessivos ciclos de propagação de alho (CONCI et al., 2010). O resultado do acúmulo de complexos virais ao longo dos anos causa forte degenerescência, diminuindo o potencial produtivo do alho. A técnica de cultura de tecidos é a mais utilizada para o controle de viroses, utilizando limpeza clonal (SILVA et al., 2010; CONCI et al., 2010; RESENDE et al., 2004).

Associado a esta técnica, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) pode favorecer o desenvolvimento vegetal através de mecanismos diretos, como disponibilização de macronutrientes e produção de fitormônios; ou por mecanismos indiretos, como controle biológico de fitopatógenos e aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos (BULGARELLI et al., 2013). Esses mecanismos de promoção do crescimento vegetal podem ser explorados em benefício de uma agricultura mais sustentável e de menor impacto ambiental.

Sendo assim, faz-se necessário conhecer o potencial destas bactérias em relação ao alho. Portanto, o objetivo deste estudo foi de isolar e identificar bactérias endofíticas de raiz de alho e avaliar o potencial de promoção de crescimento por meio dos testes de produção de auxinas, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Após isso, selecionar as quatro melhores bactérias a partir dos resultados desses testes, inocular em meristemas de alho em cultura de tecidos e avaliar o crescimento dessas plantas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Alho - *Allium sativum* L.

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça originária da Ásia Central, sendo cultivada há séculos em praticamente todo mundo e considerada de grande importância social e econômica (MOURA et al., 2013). É uma das mais antigas espécies olerícolas cultivada pelo homem, devido a sua indiscutível importância como condimento, valor nutricional, terapêutico e geração de emprego e renda (MENEZES JÚNIOR, 2011). Além disso, apresenta propriedades medicinais, auxiliando na prevenção de doenças cardíacas e circulatórias, além de ser anti-inflamatório (QUEIROZ et. al., 2009).

Pertencente à família *Alliaceae*, o alho se caracteriza como uma planta herbácea, com folhas lanceoladas, pontiagudas e achatadas. O bulbo se origina do pseudocaule formado pelas bainhas das folhas, e é subdividido em estruturas ovaladas denominadas de bulbilhos (FILGUEIRA, 2008).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2017) a produção mundial de alho em 2013 foi de 24.255.302,57 toneladas. Essa produção vinha aumentando desde 2008, sofrendo pequena redução de 3,2% em 2009 e aumentando em 2013, último levantamento realizado mundialmente. Atualmente, os maiores produtores mundiais são China, Índia, Coreia do Sul, Egito e Rússia, detentores de mais de 85% da produção total.

Dados da FAO (2017) destaca a China como maior país produtor, exportador e consumidor mundial de alho, exportando em torno de 8% do que produz durante os doze meses do ano, utilizando para tal a frigoconservação. As exportações anuais chinesas estão na ordem de 150 milhões de caixas de 10 quilos, sendo que, desse total, o Brasil compra 6,2%.

No Brasil, os maiores estados produtores são Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Bahia, que somaram mais de 85% de toda produção nacional. O principal produtor estimado para 2018 é o estado de Minas Gerais com um total de 44,0 mil t, uma redução de 8,4% em comparação ao ano anterior (48.139 mil t). Esse estado representou 95% da produção do Sudeste, com 36,9% da produção nacional em 2016 (BRASIL, 2017).

A produção brasileira de alho sofre forte concorrência com o produto importado, o que torna necessário o melhor controle da qualidade do alho-semente, o aumento do

uso de alhos nobres e a realização de pesquisa de cultivares capazes de produzir satisfatoriamente sob diferentes condições (TERRA et. al., 2013).

No centro sul-americano, a Argentina destaca-se como maior exportador regional de alho, tendo no Brasil seu maior comprador. A produção dos demais países da América do Sul é basicamente destinada ao mercado interno. Já o Brasil é o segundo maior importador mundial desse bulbo (FAO, 2017).

Em 2015, o abastecimento interno conseguiu suprir 42,7% do consumo de alho total, enquanto as importações contribuíram com os restantes 57,3%, sendo importado da China (59,8%), Argentina (31,6%) e de outros países (8,5%), essas últimas incluindo as importações com origem no Chile, Formosa, Espanha, Malásia, Peru e Portugal (BRASIL, 2017), mas o país enfrenta problemas com as importações de alho argentino e, segundo a ANAPA (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO, 2015), por vezes, o alho argentino apresenta baixa qualidade (chamado alho indústria), atrapalhando o mercado interno.

Como fatores limitantes para o cultivo do alho podem ser citados o fotoperíodo e temperatura, que se adequados permitem a formação de bulbos e o seu desenvolvimento, respectivamente (FILGUEIRA, 2008). Além disso, a escolha da semente e avaliação de sua sanidade é de grande importância para a cultura, promovendo maior produtividade ao evitar a disseminação de doenças (FERNANDES et al., 2013). É importante salientar que a propagação do alho não é feita por semente botânica verdadeira, ou seja, a produtividade é garantida pela qualidade dos bulbos.

Devido à concorrência com o mercado chinês, o interesse dos importadores nacionais e a falta de políticas governamentais efetivas têm, muitas vezes, prejudicando alguns produtores brasileiros. Uma das estratégias adotadas para o aumento em produtividade tem sido a cultura de tecidos vegetais. Essa técnica propicia que culturas propagadas por via vegetativa se recuperem da degenerescência causada pelo acúmulo de viroses estabelecidas ao longo dos ciclos de cultivo (MENEZES JÚNIOR, 2011).

Assim, a limpeza clonal pode ser efetuada mediante o emprego da cultura de meristemas para que se tenha aumento da produtividade das cultivares brasileiras, livrando-as dos vírus que as infeccionam (MENEZES JÚNIOR, 2011, SOUZA; MACEDO, 2009).

2.2. Cultivo *in vitro*

O termo cultura de tecidos é utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas, como temperatura, fotoperíodo, meios de cultivo, entre outros. O cultivo *in vitro* é uma tecnologia agrônômica, que possibilita a produção de biomassa em maior escala, por um curto espaço de tempo em menor espaço físico (FALEIRO et al., 2011).

Segundo Haberlandt (1902) o princípio básico da cultura de tecidos baseia-se na totipotência, segundo o qual qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa. Uma das principais aplicações das técnicas de cultura de tecidos vegetais é a micropropagação, que consiste na multiplicação rápida de espécies vegetais e essa rapidez deve-se, entre outros fatores, à possibilidade de obter elevado número de explantes a partir de uma planta matriz ou órgãos especializados (bulbos, no caso de alho). A velocidade da multiplicação é devido ao controle tanto do meio de cultura que se utiliza quanto das condições ambientais nas quais se conduz a multiplicação (QUISEN et al, 2008).

O custo elevado pode se apresentar como uma desvantagem à primeira vista, porém a utilização da técnica é justificada pela crescente demanda por plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, além do incremento da capacidade de síntese de metabólitos secundários, por meio do melhoramento genético (LIMA, 2007).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies, mas o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, condições de incubação, dentre outros. Também para desenvolvimento desses protocolos de micropropagação de uma dada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro* (MORAIS et al, 2012).

Com relação aos meios de cultura mais utilizados no cultivo *in vitro* destaca-se o desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), o meio MS. Esse meio de cultura é universalmente usado, especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas, e caracteriza-se por elevada concentração de sais minerais. (QUISEN et al, 2008).

Trabalhos relatam o uso da micropropagação de alho com diversos objetivos, mas a limpeza clonal através da cultura de meristema é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos vegetais mais regularmente aplicada (VIEIRA et al, 2014).

A propagação vegetativa do alho, através de bulbilhos, favorece o acúmulo e a disseminação de viroses ao longo dos ciclos de cultivo. As infecções virais produzem estrias cloróticas foliares com colorações variáveis do amarelo-claro ao verde-claro, nanismo e redução do tamanho dos bulbos, e tais sintomas podem ser causados por diferentes vírus (MENEZES JÚNIOR, 2011).

A propagação do vírus de uma geração a outra pode ser evitada ou reduzida, por meio da multiplicação intermediária *in vitro* do material propagativo infectado que permite quebrar o ciclo reprodutivo do vírus, recuperar o vigor vegetativo e resgatar a produtividade das cultivares. Embora o controle do vírus não seja total, a regeneração das plantas *in vitro* permite a obtenção de taxas de 80 a 95% de plantas livres de vírus (SOUZA et al., 2002).

O uso de alho-semente livre de vírus está se consolidando como uma das tecnologias mais importantes para o desenvolvimento da cadeia produtiva do alho no Brasil. O principal motivo para a adoção desta tecnologia deve-se aos danos causados pelos complexos virais disseminados ao longo dos anos e sucessivos ciclos de multiplicação do alho por meio dos bulbilhos. Em campos de produção de alho, as plantas livres de vírus apresentam maior vigor vegetativo e produtividade do que as plantas de propagação convencional, infectadas por vírus (ALMEIDA & VILELA, 2008).

A propagação vegetativa do alho por meio de bulbilhos contribui para a disseminação de várias doenças, principalmente viroses (WALKEY & ANTILL, 1989), o que ocasiona degenerescência das plantas pela redução da produtividade (MELO-FILHO et al., 2006; TORRES et al., 2000). Os vírus são transmitidos de uma planta para outra por pulgões como os *Potyvirus* e *Carlavirus* ou por ácaros como o *Allexivirus* (FERNANDES et al., 2013).

O meristema apical não tem conexão vascular com os tecidos do floema e xilema do caule, sendo esta uma das razões do porque o meristema não é atingido pelo vírus que tem transporte sistêmico pelos vasos condutores. Outras possíveis razões para que não tenha contaminação do meristema por vírus é que a multiplicação do meristema é muito mais intensa que a do vírus, além de que o meristema é o tecido onde tem maior produção de auxina, o que pode impedir a multiplicação do vírus na planta. Assim, a cultura de meristemas ou ápices meristemáticos é usada para gerar plantas livres de patógenos que subsequentemente servem como propágulos para a micropropagação (FALEIRO et al, 2011; MENEZES JÚNIOR, 2011).

De acordo com Souza et al. (2002), dentre as hipóteses que podem ser atribuídas para a ausência de vírus nos meristemas, tem-se a competição entre a produção de células do meristema e de partículas virais; durante a divisão celular, a capacidade para síntese de ácidos nucleicos está sendo utilizada para a produção de células em detrimento à multiplicação de vírus; a ausência de elementos vasculares no meristema dificulta o transporte viral; presença de inibidores naturais nos meristemas (como as auxinas) e/ou substâncias do meio de cultivo que interfeririam na multiplicação dos vírus, entre outros.

Substâncias orgânicas como aminoácidos proporcionam diversos benefícios às plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A participação deles levou a estudos sobre as interações da planta com microrganismos, disponibilidade de nitrogênio e as implicações ecológicas do uso por plantas, considerando as mudanças de clima e poluição (LIPSON et al., 2001; DAVIDSON et al., 2007).

Alguns aminoácidos possuem função de ativadores do metabolismo, como por exemplo, triptofano que em quantidades extremamente pequenas atua como precursor do hormônio mais importante para o crescimento das plantas, o ácido-indol-acético (TAIZ et al., 2017). A metionina é o precursor do hormônio etileno, responsável pela maturação de frutos e também relacionado à senescência (MOHR & SCHOPFER, 1995).

Os aminoácidos tirosina e fenilalanina são os precursores dos compostos fenólicos como o ácido cinâmico, o ácido cumárico e flavonas, envolvidos com a defesa das plantas, são também precursores da síntese de lignina na planta, que aumenta a resistência ao acamamento (SINHA, 2004).

Já o ácido glutâmico desempenha papel fundamental na eficiência do metabolismo do nitrogênio, pois é o primeiro composto formado na assimilação desse elemento, formando as amidas, glutamina e asparagina, e a partir desses, o transporte para os diferentes órgãos da planta e a síntese de clorofila e outros aminoácidos (TAIZ et al., 2017).

Mesmo sujeito à reinfecção no primeiro ano de cultivo em campo aberto (CONCI et al., 2010), o material de alho livre de vírus apresenta aumento de 100 a 200% na produtividade, inclusive concentrando a produção dos bulbos nas classes de tamanho de maior valor comercial (TORRES et al., 2000).

2.3. Uso de Fertilizantes e Seus Riscos

Para um crescimento ideal das plantas, os nutrientes devem estar disponíveis em quantidades suficientes e equilibradas. Os solos contêm reservas naturais de nutriente, mas essas reservas são em grande parte em formas indisponíveis para as plantas, e apenas uma porção menor é liberada a cada ano por meio de atividade biológica ou processos químicos. Esta liberação é muito lenta para compensar a remoção de nutrientes pela produção agrícola e atender às necessidades das culturas. Portanto, os fertilizantes são projetados para suplementar os nutrientes já presentes no solo (SAVCI, 2012).

Os fertilizantes não orgânicos contêm principalmente sais de fosfato, nitrato, amônio e potássio. Segundo Sonmez et al. (2008), os fertilizantes industriais contêm uma grande quantidade de metais pesados como Hg, Cd, As, Pb, Cu, Ni e Cu. No entanto, nos últimos anos, o uso de fertilizantes aumentou exponencialmente em todo o mundo, causando sérios problemas ambientais. A fertilização pode afetar o acúmulo de metais pesados no solo e no sistema da planta. Podendo assim, levar à poluição da água, do solo e do ar.

Segundo Korkmaz (2017) e Sonmez et al. (2008), o nitrogênio nas áreas agrícolas atinge o meio aquático de três maneiras: drenagem, lixiviação e escoamento. A lixiviação de nitratos está particularmente ligada a práticas agrícolas como fertilização e cultivo. De acordo com as condições, o nitrato acumulado lixivia em quantidades variáveis e atinge a profundidade do solo e posteriormente o lençol freático devido a carga negativa do nitrato. Mesmo em condições ideais, as plantas utilizam 50% dos fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo, 2-20% são perdidos na evaporação, 15-25% reagem com compostos orgânicos no solo e os restantes 2-10% interferem na água superficial e subterrânea.

Portanto, de acordo com as pesquisas e estudos, os efeitos dos fertilizantes químicos no solo não são imediatamente óbvios. Porque os solos têm forte poder de tamponamento devido aos seus componentes. Ao longo do tempo, afirma que emergiu da poluição, a deterioração da fertilidade do solo, reações de degradação do solo que ocorrem no solo levam à deterioração do equilíbrio do elemento atual. Além disso, substâncias tóxicas se acumulam nos vegetais e causam efeitos negativos em humanos e animais (SAVCI, 2012).

O uso de fertilizantes químicos, fertilizantes orgânicos ou biofertilizantes tem suas vantagens e desvantagens no contexto da oferta de nutrientes, crescimento das culturas e qualidade ambiental. As vantagens precisam ser integradas para otimizar o

uso de cada tipo de fertilizante e obter um gerenciamento balanceado de nutrientes para o crescimento das culturas (CHEN, 2006).

Contudo, a atividade da microbiota do solo, aliada com o uso racional de fertilizantes é muito importante para garantir o fornecimento suficiente de nutrientes para a planta. Se os microrganismos estiverem nas condições adequadas para o seu crescimento, podem ser muito eficientes na dissolução de nutrientes e na sua disponibilização às plantas. Sundara et al. (2002) descobriram que a aplicação da bactéria solubilizadora de fosfato (BSF), *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, aumentou a população na rizosfera e a disponibilidade de P no solo. Também melhorou o crescimento, rendimento e qualidade da cana-de-açúcar. Quando usado em conjunto com fertilizantes fosfatados, a BSF reduziu a dosagem de P necessária em 25%. Além disso, 50% do superfosfato podem ser substituídos por um fosfato de rocha de preço mais acessível, quando aplicado em combinação com o PSF.

Os efeitos de um tratamento combinado de biofertilizante multifuncional (mistura de *Bacillus* sp. *B. subtilis*, *B. eritropolis*, *B. pumilus* e *P. rubiacearum*) mais 50% de fertilizante químico ($\frac{1}{2}$ FQ + biofertilizante) em um tratamento com fertilizante químico (FQ) e biofertilizante no crescimento de alface foram comparados por Young et al. (2003). Os resultados mostraram que houve um aumento de 25% no rendimento de alface para o tratamento de $\frac{1}{2}$ FQ + biofertilizante comparado ao tratamento com FQ, indicando que pelo menos 50% do fertilizante químico pode ser economizado com o uso de biofertilizante multifuncional junto com fertilizantes químicos.

A gestão eficiente da nutrição das plantas deve garantir uma produção agrícola melhorada e sustentável para salvaguardar o ambiente. O fertilizante químico, orgânico ou microbiano tem suas vantagens e desvantagens em termos de oferta de nutrientes, qualidade do solo e crescimento da cultura. O desenvolvimento de um sistema adequado de gestão de nutrientes que integre o uso desses três tipos de fertilizantes pode ser um desafio para alcançar a meta da agricultura sustentável; no entanto, muita pesquisa ainda é necessária.

2.4. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos, devido às interações mutualísticas entre planta hospedeira e as bactérias associadas (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).

As BPCP 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). Assim, a interação entre planta e microrganismos promotores do crescimento vegetal pode contribuir para o crescimento, saúde e desenvolvimento da planta (BERG, 2009).

Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são: aumentos da taxa de germinação, comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, aumento do número de flores e rendimento. Podem também atuar como biocontroladoras no crescimento, infectividade, virulência e agressividade do patógeno (COMPANT et al. 2010), bem como nos processos de infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução (VAN LOON, 2007).

Entre as principais BPCP empregadas na agricultura estão espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Paenobacillus*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*. (OLIVEIRA et al., 2014; GÍRIO et al., 2015).

Vários trabalhos envolvendo bactérias do gênero *Pseudomonas* e promoção de crescimento já foram realizados. Relataram-se benefícios à alface e batata (SCHLINDWEIN, 2008), cebola (HARTHMANN et al. 2009), pimenta (SOPHER & SUTTON, 2011) e milho (OLIVEIRA et al, 2015).

Algumas espécies de *Bacillus* são 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). Mena-Violante e Olalde-Portugal (2007) verificaram efeitos positivos em frutos de tomate, como o aumento do tamanho e melhoria da textura mediante o uso de *B. subtilis*. Silva et al. (2008) aplicando *B. pumilus* observaram incrementos na altura das plantas de tomateiro nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Estudos com *Bacillus megaterium* (HARTHMANN et al., 2010) e com *Bacillus cereus* (HARTHMANN et al., 2009) inoculados em sementes mostraram a possibilidade, inclusive, de incrementos de produtividade, pois comprovaram a campo o

aumento do rendimento de bulbos de cebola. Seldin (2008) relata que, dentre as 89 espécies e 2 subespécies de *Paenibacillus* descritas na literatura, 14 possuem estirpes com a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico. São elas: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. peoriae*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. brasiliensis*, *P. durus*, *P. borealis*, *P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabinae*, *P. zanthoxyli*, *P. donghaensis* e *P. forsythiae*. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de conhecer cada vez mais as potencialidades das BPCP e tem tido sucesso na medida em que já existem produtos comerciais à base destas em vários países como Estados Unidos, Austrália e China (FIGUEIREDO et al., 2010).

Apesar de bem estabelecidas como produtos biológicos para controle de doenças e pragas, o uso de BPCP na produção de mudas micropropagadas ainda está em fase inicial. Os efeitos benéficos 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. No campo, observa-se proteção contra doenças e aumento de produtividade (FALEIRO et al, 2011).

2.5 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).

Mecanismos diretos são definidos como a aplicação de culturas bacterianas que resultam na promoção direta do crescimento das plantas (OLANREWAJU et al., 2017). Dentre os mecanismos diretos podem ocorrer por meio da síntese de fitormônios (auxina, citocinina, giberilina), fixação de nitrogênio atmosférico, síntese de enzimas (tais como ACC desaminase) que modulam o nível de hormônios vegetais e disponibilização de nutrientes para a planta, dentre eles fósforo e zinco, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos. (JAMES & BALDANI, 2012; CASSÁN et al., 2014).

Mecanismos indiretos referem-se a características bacterianas que inibem o funcionamento de um ou mais organismos fitopatogênicos, tanto fungos quanto bactérias (OLANREWAJU et al., 2017). Os mecanismos indiretos incluem o controle biológico por competição de nutrientes, ACC deaminase, antibióticos, enzimas que degradam a parede celular, resistência sistêmica induzida, quenching extingüível e produção de

sideróforos e cianeto de hidrogênio (IGARASHI et al., 2002a; IGARASHI et al., 2002b; OLANREWaju et al., 2017; YANG et al., 2009; BULGARELLI et al., 2013).

Através da fixação do nitrogênio, da biodisponibilização do fosfato, da aquisição de ferro, da exposição da atividade específica enzimática e da proteção das plantas contra patógenos nocivos pela produção de antibióticos, as bactérias promotoras do crescimento em plantas podem melhorar a qualidade das culturas agrícolas (SPAEPEN et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais as bactérias podem influenciar no crescimento da planta irão diferir entre espécies e cepas, então, tipicamente não existe apenas um mecanismo para promoção do crescimento vegetal, e sim uma combinação de vários mecanismos diretos e indiretos. Estudos têm sido conduzidos em relação às habilidades de várias bactérias para promover o crescimento das plantas, dentre elas as bactérias endofíticas (SOUZA et al., 2015).

Os endófitos são convencionalmente definidos como bactérias ou fungos que colonizam os tecidos internos das plantas, podendo ser isolados da planta após a desinfecção da superfície e não causam efeitos negativos no crescimento das plantas (GAIERO et al., 2013). Muitas bactérias promovem o crescimento das plantas em vários estágios do ciclo de vida da planta hospedeira através de diferentes mecanismos (SOUZA et al., 2015). Neste trabalho discutimos três mecanismos importantes das BPCP.

2.5.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

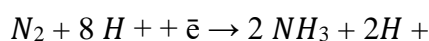
O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial para os organismos vivos e juntamente com carbono e hidrogênio, participa na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos, clorofila entre outras. As principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos envolve a presença do nitrogênio, tornando-o um dos elementos absorvidos em maiores quantidades pelas plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Entretanto, na natureza, este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável, e, portanto, sua assimilação é limitada, requerendo a transformação para uma forma combinada (NH_4 e NO_3) que facilite sua assimilação (TAIZ et al., 2017). 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.

A transformação do N₂ a formas combinadas pode ser realizada através de três processos: fixação atmosférica, fixação industrial e fixação biológica. A fixação atmosférica refere-se às descargas elétricas, que ocorrem naturalmente. A fixação industrial refere-se à produção de fertilizantes nitrogenados, que além da utilização de combustíveis fósseis, requerem elevadas temperatura e pressão no processo de fabricação, tornando-os muito caros.

Assim, o custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é elevado e resulta na necessidade de gasto de energia não renovável (OLIVEIRA et al., 2014). Práticas alternativas para diminuir esses custos têm sido procuradas, principalmente no Brasil, que importa fertilizante nitrogenado para satisfazer à demanda interna (HUNGRIA, 2011).

O processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em amônia e a reação é catalizada pela enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos diazotróficos (TAIZ et al., 2017). Este complexo é baseado em uma série de reações redox através de complexos proteicos formados por ferro e molibdênio, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) para a forma inorgânica combinada, a amônia (NH₃), que se torna disponível para plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), como demonstrado na seguinte equação:



Com o emprego das bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura é possível economizar milhões de dólares de petróleo e gás natural, utilizados para síntese de amônia, simultaneamente contribuir para aumentos de produtividade (BOTTA et al., 2013) e diminuir a poluição de rios e lagos.

Os organismos fixadores de N₂, também denominados de diazotróficos, apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, garantindo a ocorrência da FBN nos mais diversos tipos de ecossistemas. Eles podem ser de vida livre, formar associações e/ou simbiose com outros organismos. De modo geral, a maior contribuição da FBN, para organismos que não fixam o N₂, ocorre quando são estabelecidas interações, como as associações e principalmente simbioses (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Para mensurar este processo *in vitro* é necessário um ambiente fechado para retirada dos gases atmosféricos e injeção de acetileno nesta atmosfera. Deste modo, o complexo nitrogenase irá capturar o acetileno (C₂H₂) e reduzi-lo a etileno (C₂H₄), incorporando elétrons à reação. Assim, tem-se como produto o gás etileno, que é

passível de mensuração via cromatografia gasosa, estimando a atividade do complexo enzimático nitrogenase por meio do produto da reação (GUIMARÃES et al., 2018).

Além do benefício proveniente da FBN, algumas estirpes de BPCP podem beneficiar o hospedeiro através da liberação de substâncias promotoras de crescimento vegetal. A estimulação pode ser devido à produção de fitormônios, como ácido-3-indol acético (AIA), produção de exopolissacarídeos e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (BOMFETI et al., 2011; MARRA et al., 2011).

2.5.2 Produção de Auxinas

Fitormônios desempenham um papel importante como reguladores de crescimento e desenvolvimento de plantas (CASSÁN et al., 2014). De acordo com classificação convencional, existem cinco grupos de fitormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, e ácido abscísico (COHEN et al., 2008; CASSÁN et al., 2014).

Fitormônios são substâncias orgânicas produzidas em determinados locais da planta e que são transportados para outros tecidos onde desencadearão alterações metabólicas, sendo requeridos em baixas concentrações, sendo conhecido por sua capacidade de atuar no desenvolvimento de raízes, na expansão celular aumentando a absorção de nutrientes e água, estimulam germinação de sementes e tubérculos bem como o fluxo de água e sais minerais pelo xilema, tropismo, florescência, frutificação, formação de pigmentos, biossíntese de vários metabólitos e resistência a fatores de estresse (TSAVKELOVA et al, 2006; VESSEY, 2003, FIGUEIREDO et al., 2010).

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, com diversas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas, estando presente na maioria dos estádios do ciclo de vida de um vegetal, da germinação à senescência (OLIVEIRA et al., 2014). Este grupo hormonal regula alguns processos, como dominância apical, abscisão foliar, formação de raízes laterais e diferenciação vascular (TAIZ et al., 2017)

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.

Evidências indicaram que o crescimento das plantas pode ser regulado positivamente pela AIA, como o alto número de raízes laterais e hipocótilos longos na mandioca e até mesmo uma super-raiz, através de um mutante no qual o AIA é superproduzido (BOERJAN et al., 1995; ZHAO et al., 2001). O AIA produzido em um filtrado de 12 culturas microbianas produtoras de auxina aumentou a relação da parte aérea para raiz e diminuiu o alongamento da raiz (LOPER et al., 1986).

Muitos dos microrganismos que interagem com plantas possuem a capacidade de sintetizar hormônios semelhantes aos vegetais (DOBBELAERE et al., 2003; RAVEN et al., 2001). Algumas bactérias são capazes de sintetizar alguns hormônios e seus análogos, tais como: auxinas, citocininas (AHMED e SHAHIDA, 2010;) e giberelinas (BOTTINI et al., 2004).

2.5.3. Solubilização de Fósforo

Após o nitrogênio, o fósforo (P) é o macronutriente que mais limita o desenvolvimento dos vegetais. É um componente estrutural de macromoléculas, como ácidos nucleicos e fosfolipídios, e também da adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas tais como inúmeras etapas das vias C3 e C4, do ciclo de Calvin e da glicólise, fotossíntese, armazenamento e transferência de energia, entre outros processos metabólicos (TAIZ et al., 2017).

Nos sistemas de produção agrícola, são necessárias aplicações de fósforo inorgânico no solo para garantir a produtividade, pois este macronutriente normalmente não está disponível (NOVAIS et al., 2007). A dinâmica do P no solo é complexa, este nutriente pode ser adsorvido nos hidróxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) pela precipitação com estes elementos em solos ácidos e com cálcio (Ca) em solos alcalinos (GYANESHWAR et al., 2002; REICHARDT e TIMM, 2004).

Esta baixa disponibilidade de fósforo para as plantas é porque a maioria do solo P é encontrada em formas insolúveis, enquanto as plantas absorvem apenas duas formas solúveis, os íons monobásicos (H_2PO_4^-) e o dibásicos (HPO_4^{2-}) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). O P insolúvel está presente como um mineral inorgânico, como a apatita

ou como uma das várias formas orgânicas, incluindo fosfato de inositol (fitato do solo), fosfomonômeros e fosfotriésteres (GLICK, 2012).

A utilização de microrganismos solubilizadores de (P) é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do (P) já existente no solo (SILVA FILHO & VIDOR, 2001), exercendo um papel central no seu ciclo natural (NOVAIS et al., 2007). Os microrganismos solubilizadores de (P) são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, como o glucônico, cítrico, glutâmico, oxálico láctico, fumárico, tartárico e succínico, os quais atuam como doadores de prótons e agentes quelantes dos íons Ca, Al e Fe, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico do solo (CHUNG et al., 2005).

As bactérias são as que se destacam com o maior potencial entre os microrganismos para obtenção de fosfatos solúveis também como inoculantes para as culturas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os principais gêneros bacterianos descritos são: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia*, os quais são hábeis na solubilização de fosfato inorgânico, promovendo o crescimento de plantas juntamente com a produção de fitormônios, vitaminas e antibióticos (BHATTACHARYYA & JHA, 2012; RODRIGUEZ et al., 2004).

2.6 Identificação de Microrganismos por MALDI-TOF MS

A utilização da espectrometria de massa (MS) como forma de identificação de microrganismos se iniciou nos anos 1970, mas o grande impulso para a evolução da tecnologia foi dado por Tanaka et al. (1988). Estes pesquisadores conseguiram ionizar grandes moléculas por laser, utilizando uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol. Previamente não era possível ionizar moléculas não voláteis ou de grande peso molecular (ANHALT & FENSELAU, 1975; TANAKA et al., 1988).

O termo MALDI (*Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*) significa dessorção/ionização por laser assistido por matriz. Os equipamentos de MS apresentam variados analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre tais analisadores/separadores de íons, há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo (TOF: *time of light*) (GOULART & RESENDE, 2013).

A identificação por MALDI-TOF MS é feita baseada nas verificações de que impressões espectrais são variadas entre microrganismos e entre os compostos detectados no espectro, alguns picos (massas moleculares) são específicos para o gênero, espécie, e por vezes a subespécies, assim, os espectros obtidos são reprodutíveis desde que as bactérias sejam cultivadas nas mesmas condições (CARBONELLE et al., 2011).

Portanto, as condições de crescimento bem controladas e os procedimentos de preparo das amostras são cruciais para a obtenção de espectros de massa reprodutíveis. A composição da solução utilizada para solubilizar as bactérias pode modificar o espectro de uma dada estirpe. Por exemplo, os métodos de extração de proteína e a concentração de NaCl também podem influenciar a qualidade dos espectros modificando a cristalização da amostra com a matriz. Essas observações ressaltam a necessidade de uma atenção especial na preparação da amostra para obter um espectro de alta precisão e reprodutibilidade (CARBONELLE et al., 2011).

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido utilizada com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de microrganismos, dentre inúmeras outras aplicações (GOULART & RESENDE, 2013). Na identificação de microrganismos, uma grande quantidade de moléculas é detectada simultaneamente como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, gerando um espectro que é característico de cada espécie (ASSIS et al., 2011).

Quando se compara a tecnologia MALDI-TOF MS com outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos, a principal vantagem dessa tecnologia é a agilidade para obtenção dos resultados. Entre o preparo do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de 30 minutos (CROXATTO et al., 2012). Por isso, este método de identificação tem sido exaustivamente empregado na identificação de bactérias e fungos filamentosos de interesse clínico (WELKERA & MOOREC, 2011).

Amostras ambientais são mais difíceis de serem analisadas por ocorrer naturalmente mudanças no perfil de proteínas, além de possuir apenas uma pequena fração de isolados ambientais nas bases de dados de espectro de massa. Devido ao interminável desenvolvimento da tecnologia de análise de microrganismos e da natureza instável da taxonomia microbiana, muitas vezes cepas foram atribuídos a espécies que subsequentemente sofrem alterações na nomenclatura, podendo causar eventual confusão (WELKERA & MOOREC, 2011). Assim, se faz necessário mais estudos

envolvendo isolados ambientais de importância industrial para atualização do banco de dados, pois a maioria das matérias-primas de origem vegetal podem conter microrganismos que são muito distintos de isolados clínicos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 313-319, 2010.
- ALMEIDA, V. E. S.; VILELA, N. J. Impactos ambientais e econômicos do alho livre de vírus para a agricultura familiar. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 37-63, 2008.
- 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.
- ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 47, p. 219-225, 1975.
- ASSIS, D. M. et al. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. Brasília: ANAPA, 2015. Disponível em: <<http://www.anapa.com.br/simples/?p=3929>>. Acesso em 10 julho 2018.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 84, p. 11-18, 2009.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BOERJAN, W. et al. Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. **The Plant Cell**, v. 7, n. 9, p. 1405-1419, 1995.
- BOMFETI, C. A. et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 657-671, 2011.
- BOTTA, A. L. et al. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**. v. 30, n. 6, p.666-674 2013.
- BOTTINI, R. et al. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 497-503, 2004.
- BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemtico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201704.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemtico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201704.pdf)> Acesso em 11 julho 2018.

BRASIL, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO (FAO). Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_16_11_54_07_alho_abril_2017.pdf> Acesso em 10 julho 2018.

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

CARBONELLE, E. et al. Application of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Medical Sciences**, Paris, v. 10, p. 882-888, 2011.

CASSÁN, F. et al. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.

CHEN, J-H. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In: **International workshop on sustained management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use**. Land Development Department Bangkok, Thailand, p. 20., 2006.

CHUNG, H. et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p.1970–1974, 2005.

COHEN, A. C. et al. *Azospirillum brasilense* sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 97–103, 2008.

COMPANT, S. S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

CONCI, V. C. et al. The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 3, p. 186-193, 2010.

CROXATTO, A. et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DAVIDSON, E. A. et al. Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. **Nature**, v. 447, p. 995-997, 2007.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, p. 107-149, 2003.

FALEIRO, F. G. et al. **Biotechnologia: estado da arte e aplicações da agropecuária**. Planatina, DF. Embrapa Cerrados. 1 ed. 2011.

FERNANDES, F. R. et al. **Viroses do alho no Brasil: importância e principais medidas de controle**. Brasília: EMBRAPA, 9 p., 2013.

- 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. 1 ed. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Recife, PE, Embrapa, p. 387-414, 2010.
- FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Viçosa, MG: Editora UFV**, 2008.
- GAIERO, J. R. et al. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American journal of botany**, v. 100, n. 9, p. 1738-1750, 2013.
- GARCIA, T. V. et al. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-9, 2015.
- GÍRIO, 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**, v. 50, n. 1, p. 33-43, 2015.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p.1-15, 2012.
- GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, Belo Horizonte, v.1, n. 3, nov. 2013. Disponível em: <<http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>> Acesso em: 02 de julho de 2018.
- GUIMARÃES, V. F. et al. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. **CIÊNCIAS AGRÁRIAS: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária**, n. 11, p. 192-212, 2018.
- GYANESHWAR. P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.83-93, 2002.
- HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. **Wien, math.-naturw. Klasse**, v. 111, p. 1913-1921, 1902.
- HARTHMANN, O. E. L. et al. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural**, vol. 40, n. 2, p. 462-465, 2010.
- HARTHMANN, O. E. L. et al. Tratamento de sementes com rizobactérias na produção de cebola. **Ciência Rural**, vol. 39, n. 9, p. 2533-2538, 2009.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento. Londrina, PR, Embrapa Soja, 2011.
- IGARASHI, Y. et al. Isolation of actinomycetes from live plants and evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 16, p. 9-13, 2002a.

- IGARASHI, Y. et al. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygrosopicus* TP-A0451. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 55, n. 8, p. 764-767, 2002b.
- JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.
- KORKMAZ, K. **Tarım Girdi Sisteminde Azot ve Azot Kirliliği**. 2017. Disponível em < http://www.ziraat.ktu.edu.tr/tarim_girdi.htm > Acesso em 11 julho 2018.
- LANZOTTI, V. et al. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochemistry reviews**, v. 13, n. 4, p. 769-791, 2014.
- LIMA, S. M. Influência de fitorreguladores no crescimento in vitro de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 669-671, 2007.
- LIPSON, D.; NÄSHOLM, T. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia**, v. 128, n. 3, p.305–316, 2001.
- LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v. 76, n. 4, p. 386-389, 1986.
- MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v.68, n.5, p.603-609, 2011.
- MELO-FILHO, P. A. et al. Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 116, n. 2, p. 95-101, 2006.
- MENA-VIOLANTE, H; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v. 113, n. 1, p. 103-106, 2007.
- MENA-VIOLANTE, H. G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 103-106, 2007.
- MENEZES JÚNIOR, F. O. G. Cultivo in vitro do alho visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 158-167, 2011.
- MOHR, H.; SCHOPFER, P. Photomorphogenesis. **Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, p. 345–369, 1995.
- MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu. v.14, n.1, p.1-12, 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Biotecnologia do Solo**. Editora UFLA, Lavras, 2006.
- MOURA, A. P. et al. Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho. Brasília: **Embrapa hortaliças**, p. 1-12, 2013.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p.473–497, 1962.
- NOVAIS, R. F. et al. Fertilidade do solo. Viçosa, Mg: SBCS, p. 471-550, 2007.
- OLANREWAJU, O. S. et al. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 2017.
- OLIVEIRA, A. L. M. 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**. v.38, n.1, p. 18-25, 2015.
- PEREIRA, G. V. 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.
- QUEIROZ, Y. S. et al. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**. v. 115, n.1, p. 371–374, 2009.
- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus, AM. Embrapa Amazônia Ocidental, p 1-49, 2008.
- RAVEN, P. H. et al. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 906, 2001.
- REICHARDT, K.; TIMM, L. C. **Absorção de nutrientes pelas plantas. Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**. São Paulo: Ed. Manole, p. 341-362, 2004.
- RESENDE, F. V. et al. **Recomendações básicas para a produção de alho em pequenas propriedades**. Embrapa Hortaliças, 2004.
- RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**. v.91, n.11, p. 552-555, 2004.
- SAVCI, S. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. **Apctee Procedia**, v. 1, p. 287-292, 2012.
- SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p.658-664. 2008.
- SELDIN, L. *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio: parte II: microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, v. 1, p. 259-276, 2008.

- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.
- SILVA, E. C. et al. Yield of garlic cultivars for nine consecutive years after the tissue culture. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 5, p. 692-697, 2010.
- SILVA, J. R. C. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.
- SINHA, N. Criteria for Sustainable Exploitation of Minerals and Natural Resources. Proceedings of the International Conference on Technology and Management for Sustainable Exploitation of Minerals and Natural Resources (TAMSEM). **Indian Institute of Technology**, Kharagpur. v. 1, n. 17. p.5-7, 2004.
- SÖNMEZ, İ. et al. Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri. **Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi**, v. 25, n. 2, p. 24-34, 2008.
- SOPHER, C. R.; SUTTON, J. C. Quantitative relationships of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 to *Pythium* root rot and growth in hydroponic peppers. **Tropical plant pathology**, v. 36, n. 4, p.214-224, 2011.
- SOUZA, R. et al. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. S. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, 2004.
- SOUZA, R. J. et al. **Cultura do alho**. Textos Acadêmicos. Lavras: Ed. UFLA, 90p., 2002.
- SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.
- SUNDARA, B. et al. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**, v. 77, n. 1, p. 43-49, 2002.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TANAKA, K. et al. Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 20, p. 151-153, 1988.
- TERRA, B. J. O. et al. Características morfológicas e produtividade de cultivares de alho em manejo orgânico na microrregião do Campo das Vertentes-MG. **Revista Agrogeoambiental**, v. 5, p. 65-71, 2013.
- TORRES, A. C. et al. Shoot tip culture and thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 192-195, 2000.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**.v.42, n.2, p.117-126, 2006.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 243–254, 2007.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VIEIRA, R. L. et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 439-445, 2014.

WALKEY, D. G. A.; ANTILL, D. N. Agronomic evaluation of virus-infected garlic *Allium sativum* L. **The Journal of Horticultural Science**, London, v. 64, n. 1, p. 53-60, 1989.

WELKERA, M.; MOOREC E. R. B. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. **Systematic and Applied Microbiology**, Germany, v. 34, n. 1, p. 2–11, 2011.

YANG, J. et al. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 1-4, 2009.

YOUNG, C. C. et al. Exploring the microbial potentially to augment soil fertility in Taiwan. In: **Proceedings of the 6th ESAFS international conference: soil management technology on low productivity and degraded soils, Taipei, Taiwan**. p. 25-27, 2003.

ZHAO, Y. et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 306-309, 2001.

[Artigo a ser submetido à publicação no periódico Microbiological Research
(ISSN: 0944-5013), 2018]

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAIZ DE ALHO (*Allium sativum* L.) E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

RESUMO

O alho possui grande relevância econômica e social, sendo cultivado há séculos em praticamente todo o mundo. O uso de fertilizantes químicos aumenta o custo de produção da cultura, viabilizando a pesquisa de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) como forma alternativa ao uso destes insumos. Os métodos convencionais de identificação dessas bactérias envolvem etapas trabalhosas, além de possuírem baixa confiabilidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS na identificação de BPCP isoladas de raiz de alho e avaliar o potencial promotor de crescimento destes isolados *in vitro*. Foram obtidos 48 isolados com 19 morfotipos diferentes a partir da técnica de plaqueamento em superfície nos meios de cultivo ágar LB e NFb. Estes isolados foram identificados por MALDI-TOF MS e agrupados a partir do seu perfil proteico. Os gêneros mais frequentes foram *Bacillus* (48%) e *Enterobacter* (21%). Foram feitos testes de produção de auxina, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato para estes isolados e para três cepas da Coleção de Cultura de Microrganismos da Microbiologia Agrícola – UFLA (CCMA 0056, CCMA 1285, CCMA 1291). Os isolados com melhor resultado para todos os testes foram M9A, M13C, M18B e M19B, indicados para utilização como BPCP.

Palavras-chave: Auxinas; Fixação de Nitrogênio; Solubilização de Fosfato; MALDI-TOF MS.

ISOLATION OF ENDOFITIC BACTERIA OF GARLIC ROOT (*Allium sativum* L.) AND CHARACTERIZATION OF POTENTIAL GROWTH PROMOTER IN PLANTS

ABSTRACT

Garlic has great economic and social relevance, being cultivated for centuries all over the world. The use of chemical fertilizers increases the crop's production cost, enabling the research of plant growth promoting bacteria (PGPB) as an alternative way to use these inputs. Conventional identification methods of these bacteria involve laborious steps, besides having low reliability. Thus, the aim of this work was to use MALDI-TOF MS technique in the identification of PGPB isolated from garlic root and evaluate the potential growth promoter of these isolates *in vitro*. It was obtained 48 isolates with 19 different morphotypes through spread-plate technique on LB and NFb agar media. These isolates were identified by MALDI-TOF MS and grouped according to their protein profile. The most frequent genera were *Bacillus* (48%) and *Enterobacter* (21%). Tests of auxin production, nitrogen fixation and phosphate solubilization were carried out for these isolates, and for three strains of the Agricultural Microbiology Culture Collection - UFLA (CCMA 0056, CCMA 1285, CCMA 1291). The isolates with the best result for all tests were M9A, M13C, M18B and M19B, which are indicated for inoculation as PGPB.

Keywords: Auxin; Nitrogen Fixation; Phosphate solubilization; MALDI-TOF MS.

1 INTRODUÇÃO

O alho possui grande relevância econômica e social, sendo cultivado há séculos em praticamente todo o mundo devido a sua indiscutível importância como condimento, terapêutico, geração de emprego e renda (MOURA et al., 2013; MENEZES JÚNIOR, 2011). O alho é uma planta herbácea, pertencente à família *Alliaceae*. O bulbo se origina do pseudocaule formado pelas bainhas das folhas e é subdividido em estruturas ovaladas denominadas de bulbilhos (FILGUEIRA, 2008).

As bactérias podem afetar positivamente o crescimento e a sanidade das plantas, enquanto as plantas podem “selecionar” bactérias benéficas para compor a sua microbiota, sendo esses microrganismos endofíticos, que colonizam os tecidos vegetais sem causar sintomas (MARASCO et al., 2012; RASHID et al., 2012; HARDOIM et al., 2008; RAZA et al., 2016). Alguns gêneros bacterianos são conhecidos por promoverem o crescimento vegetal, como *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Cromobactéria*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcous*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

A capacidade das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) favorecerem o crescimento vegetal ocorre por mecanismos diretos e/ou indiretos. A promoção direta do crescimento vegetal ocorre quando uma bactéria facilita a absorção de nutrientes pela planta como nitrogênio, fósforo e ferro ou pela modulação ou síntese de um ou mais hormônios vegetais pelas bactérias, como auxina, citocinina e giberelina. A promoção indireta do crescimento vegetal ocorre pela redução dos danos às plantas provocadas por fitopatógenos pela competição por espaço entre a BPCP e o fitopatógeno, produção de antimicrobianos específicos ou indução de resistência na planta hospedeira pela BPCP (CHEN et al., 1994; COUTINHO et al., 2015; DOTY et al., 2009; GLICK, 2015; LUO et al., 2012; NARULA et al., 2013; PANDYA et al., 2015; RASHID et al., 2012; SAINI et al., 2015).

Segundo Ali et al. (2012) e Coutinho et al. (2015), bactérias endofíticas podem oferecer vários benefícios para a planta hospedeira em condições ambientais diversas do que as bactérias rizosféricas. Apesar dos mecanismos de promoção de crescimento entre bactérias rizosféricas e endofíticas serem bastante similares, o ambiente em que estes microrganismos vivem é muito distinto. Portanto, é possível que novos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, desconhecidos em bactérias rizosféricas, possam ser descobertos em bactérias endofíticas (SANTOYO et al., 2016).

As bactérias endofíticas podem colonizar diferentes órgãos das plantas, porém a raiz é a região de principal entrada para os endófitos. Algumas linhagens colonizam principalmente um órgão vegetal, enquanto outras são capazes de colonizar toda a planta (SILVA et al., 2012; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014; MITTER et al., 2013).

No futuro, espera-se que as BPCP substituam o uso de fertilizantes químicos, pesticidas e reguladores artificiais do crescimento vegetal, que têm inúmeros efeitos colaterais para a agricultura. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos da fitoestimulação mediada por BPCP abririam caminho para encontrar linhagens de bactérias endofíticas que possam ser mais eficientes sob diversas condições de cultivo vegetal (AHEMAD & KIBRET, 2014). Diante disto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias endofíticas de raiz de alho e avaliar o potencial promotor de crescimento vegetal *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de Bactérias da Raiz de Alho

Os experimentos para o isolamento das bactérias endofíticas foram realizados no Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

Para o isolamento, foi utilizada uma amostra composta de 10 g de raiz de alho da cv. “Gigante Roxo” proveniente de uma fazenda do Espírito Santo. As raízes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico 90 % por 1 minuto, hipoclorito de sódio 10 % por 10 minutos, depois lavadas três vezes com água destilada esterilizada.

A amostra foi macerada e transferida para um frasco contendo 90 mL de água peptonada 0,1 % e agitada por 30 min a 120 rpm, correspondendo à diluição 10^{-1} e em seguida foi realizada a diluição seriada até 10^{-4} . De cada tubo foi retirado 0,1 mL da solução e transferido para os meios de cultura Luria Bertani (LB) (10 g. L^{-1} de triptona; 5 g. L^{-1} de extrato de levedura; 5 g. L^{-1} de cloreto de sódio; 15 g. L^{-1} de ágar) e ágar NFB (5 g. L^{-1} de ácido málico; 0,5 g. L^{-1} de K_2HPO_4 ; 0,2 g. L^{-1} de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g. L^{-1} de NaCl; 0,02 g. L^{-1} de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 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 $Ca_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,235 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,28 g de H_3BO_3 ; 0,008 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,024 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em 200 mL de solução); 4 mL de FeEDTA (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; 1,8 g. L^{-1} de

ágar, com pH ajustado para 6,8 sendo o mesmo suplementado com 5 g. L⁻¹ de glicose e 5 g. L⁻¹ de sacarose). Para cada diluição foram utilizadas três repetições, as placas foram incubadas a 28 ° C, por até sete dias. Após o período de incubação foi realizado a contagem e isolamento dos morfotipos pela técnica de contagem direta (DOBEREINER et al., 1995).

As características macroscópicas observadas foram: diâmetro, borda, forma, elevação e transparência das colônias. Para obtenção de colônias puras, repicou-se o valor da raiz quadrada da contagem de cada morfotipo bacteriano em meio Ágar Nutriente (AN). As culturas puras foram preservadas em glicerol 20 % à -20 °C.

2.2 Testes Fisiológicos, Bioquímicos e Identificação por MALDI-TOF MS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia e no Laboratório de Identificação Microbiana, no Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

Os isolados obtidos após a caracterização dos morfotipos foram submetidos a testes fisiológicos de coloração de Gram, motilidade e esporulação, e testes bioquímicos de catalase e oxidase. A identificação foi realizada por meio do perfil proteico dos isolados bacterianos submetidos à análise no equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics; Bremen, Germany). A extração proteica foi realizada utilizando solução orgânica (etanol, acetonitrila e água pura 1:1:1) acrescida de 10 % de ácido trifluoroacético (TFA). Alíquota de 0,7 µL da extração proteica foi adicionada à placa do MALDI-TOF MS, em triplicata. Após secagem, a amostra foi coberta com 1 µL de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) para uma concentração final de 10 mg CHCA/mL de solução orgânica.

Os espectros de massa foram processados utilizando o software BioTyper (versão 3.0; Bruker Daltonics) executado com a versão de banco de dados BioTyper DB5989. As correspondências entre os perfis experimentais MALDI-TOF MS são expressas por BioTyper de acordo com um Score (superior a 2,3 indica uma identificação altamente provável ao nível da espécie; entre 2,0 e 2,3 significa identificação altamente provável no nível do gênero e identificação provável ao nível da espécie; entre 1,7 e 2,0 implica apenas a identificação provável do gênero; abaixo de 1,7 não significa semelhança significativa entre o perfil desconhecido e qualquer um da base de dados). Um dendrograma foi construído com as cepas identificadas utilizando o BioTyper MSP

Dendrogram Creation Standard Method (versão 1.4) com configurações padrão: a medida de distância foi definida como correlação; a ligação foi definida como média; foi selecionado o dendrograma orientado a pontuação, o valor de limiar de pontuação para um organismo único foi de 300 e o valor de limiar de pontuação para organismos relacionados foi 0 (FREIWALD & SAUER, 2009).

2.3 Avaliação da Capacidade de Fixação de Nitrogênio Atmosférico, Produção de Auxina e Solubilização de Fosfato

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

As bactérias utilizadas foram as isoladas da raiz de alho e três bactérias da Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola – CCMA, UFLA (UFLA, 2015) que apresentaram melhor resultado em trabalhos anteriores (não publicado) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento

Código	Espécie	Origem geográfica	Substrato
CCMA 1285	<i>Enterobacter cloacae</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brasil	Água de fermentação de café
CCMA 1291	<i>Azospirillum brasilense</i>	EMBRAPA Londrina-PR	-
CCMA 0056	<i>Burkholderia cepacia</i>	Passos, MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Pimenta-do-Mato

2.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

Foi realizado a inoculação das bactérias por meio de picada em meio de cultura semissólido NFb em frascos de penicilina. Os frascos foram incubados em BOD a 30 °C e avaliados por até 10 dias após a inoculação. A confirmação do resultado positivo ocorre pela formação de um halo ou película aerotóxica típica próxima a superfície do meio. Como controle positivo foi utilizada a estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasilense* (DÖBEREINER, et al. 1995).

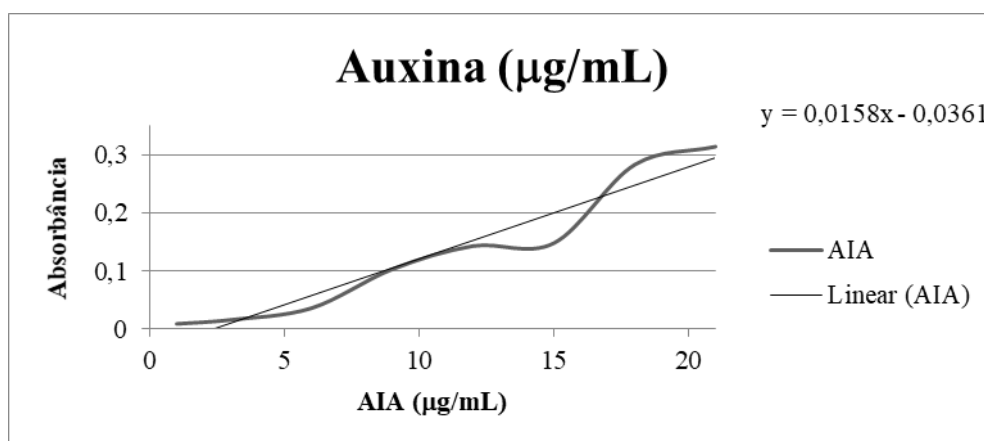
2.3.2 Produção de Auxina (AIA)

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Gordon & Weber (1951) e Loaces et al (2011). As cepas foram cultivadas em meio de cultura

caldo nutriente, incubadas em BOD a 28 °C, por 48 h, em quadruplicata. Posteriormente foi ajustada densidade óptica (D.O.) à 0,5 a 600 nm. Foram transferidos 5 % (v/v) para novo meio de cultura caldo nutriente suplementado com triptofano (100 µg/mL) e incubados novamente em BOD a 30 °C, por 72 h no escuro. A cultura foi centrifugada à 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante 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, 100mL de H₂O e 150mL de H₂SO₄ a 35%) (GORDON & WEBER 1951; LOACES et al, 2011). A mistura foi incubada em BOD a 30 °C, por 15 minutos no escuro. A D.O. foi ajustada para 530 nm e a absorbância medida de cada amostra. A quantificação foi feita por curva padrão (Figura 1) a partir de soluções com concentrações de AIA variando de 1 a 21 µg/mL. A coloração rosa-avermelhada das amostras indica a produção de auxina. Como controle positivo foi utilizada a estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasilense*.

Figura 1 – Curva padrão da produção de auxina.



2.3.3 Solubilização de Fosfato

As cepas foram cultivadas em meio de cultura caldo nutriente, incubadas em BOD a 30 °C, por 48 h. Em seguida, foi ajustada a D.O. 0,5 (10^7 - 10^8 UFC/mL) a 600 nm. Foram inoculados 10 µL da suspensão bactéria em três pontos equidistantes no meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999) e incubados em BOD a 30 °C. A avaliação foi feita a cada 3 dias por 12 dias.

A confirmação do resultado positivo ocorre pela presença de um halo translúcido em volta da colônia. O diâmetro do halo foi medido e então calculado o índice de solubilização (IS) expresso pela relação entre o diâmetro do halo (mm) / diâmetro da

colônia (mm) (AKINTOKUN et al., 2007). Com base no IS as cepas podem apresentar baixa ($IS < 2,00$), intermediária ($2,00 < IS < 4,00$) e alta ($IS > 4,0$) capacidades de solubilização. A bactéria da espécie *Burkholderia cenocepacia* foi utilizada como controle positivo.

2.4 Análises Estatísticas

O delineamento estatístico dos experimentos foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011) e as médias obtidas comparadas utilizando o teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

3 RESULTADOS

Foram isoladas 48 bactérias endofíticas das raízes de alho, apresentando 19 morfotipos de acordo com as suas características macroscópicas. Desses isolados, 26 foram isolados no meio LB, apresentando 11 morfotipos diferentes e 22 isolados no meio NFb, no qual se observou a presença de oito morfotipos distintos (Tabela 2).

A maioria das colônias apresentou forma circular (68,4 %), enquanto que 21 % apresentaram forma irregular e 10,2 % forma rizoide. Em relação a coloração das colônias, a cor predominante foi branca (12 dos 19 morfotipos - 63,2 %), apresentando variações de opaca, leitosa, brilhosa. A maioria dos isolados apresentaram colônias com diâmetro médio (9 morfotipos), seguido por diâmetro grande (6 morfotipos), e o restante foi caracterizado por um diâmetro pequeno. De acordo com a elevação das colônias, bordas e superfície, a maioria (47,4 %) apresentou a característica convexa, definida e lisa, respectivamente.

Tabela 2 – Caracterização do morfotipo das colônias bacterianas isoladas da raiz de alho.

Morfotipo	Meio	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Superfície	Cor
M1	LB	Médio	Rizoide	Umbiculada	Lombada	Rugosa	Branca, opaca
M2	LB	Grande	Irregular	Elevada	Ondulada	Verrugosa	Branca, opaca
M3	LB	Médio	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Branca, leitosa
M4	LB	Pequeno	Rizoide	Umbiculada	Definidas	Rugosa	Amarela, brilhosa
M5	LB	Grande	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa	Branca, opaca
M6	LB	Médio	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Rosa, brilhosa
M7	LB	Pequeno	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Branca, leitosa
M8	LB	Médio	Circular	Convexa	Ondulada	Rugosa	Branca, opaca
M9	LB	Médio	Irregular	Achatada	Filamentosa	Rugosa	Branca, opaca
M10	LB	Médio	Irregular	Umbiculada	Ondulada	Rugosa	Amarela, brilhosa

Continua

M11	LB	Médio	Circular	Umbiculada	Definidas	Lisa	Branca, brilhosa
M12	NFb	Grande	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Translúcida, brilhosa
M13	NFb	Pequeno	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Amarela, brilhosa
M14	NFb	Médio	Circular	Umbiculada	Lombada	Lisa	Branca, opaca
M15	NFb	Médio	Circular	Umbiculada	Irregular	Rugosa	Branca, com bordas translúcidas
M16	NFb	Pequeno	Circular	Convexa	Definidas	Verrugosa	Branca, opaca
M17	NFb	Grande	Circular	Convexa	Definidas	Lisa	Amarela, brilhosa
M18	NFb	Grande	Irregular	Achatada	Irregular	Rugosa	Amarela, opaca, com bordas translúcidas
M19	NFb	Grande	Circular	Achatada	Irregular	Rugosa	Branca, leitosa

Com os dados obtidos do perfil proteico das 48 bactérias endofíticas isoladas de raízes de alho foi construído o dendrograma do agrupamento hierárquico e identificação pela técnica MALDI-TOF MS (Figura 2). Os isolados foram agrupados em 11 grandes grupos, de acordo com a similaridade protéica, fornecendo as relações de similaridade entre cada um dos grupos detectados.

De acordo com os scores obtidos na identificação dos microrganismos, 26 (54,2%) teve score superior a 2,0, onde o resultado pode ser considerado confiável a nível de espécie, enquanto que apenas oito (16,7%) teve score inferior à 1,7, o que apenas sugere uma identificação, sem confiança de gênero e/ou espécie. Apesar disto, o dendrograma gerado permitiu agrupar estes isolados a outros com score superior a 2,0, permitindo uma identificação confiável a partir do seu perfil protéico.

Dos microrganismos identificados, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* foram predominantes, apresentando respectivamente cerca de 48 % e 21 % do total de isolados, seguidos de *Rhizobium* (6 %), *Rhodococcus* (4 %), *Kosakonia* (4 %), *Pantoea* (4 %), e os gêneros *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* e *Cellulosimicrobium* com ocorrência de apenas 2 % (Figura 3).

Figura 2 – Dendrograma do agrupamento hierárquico de bactérias endofíticas identificadas pela técnica MALDI-TOF MS.

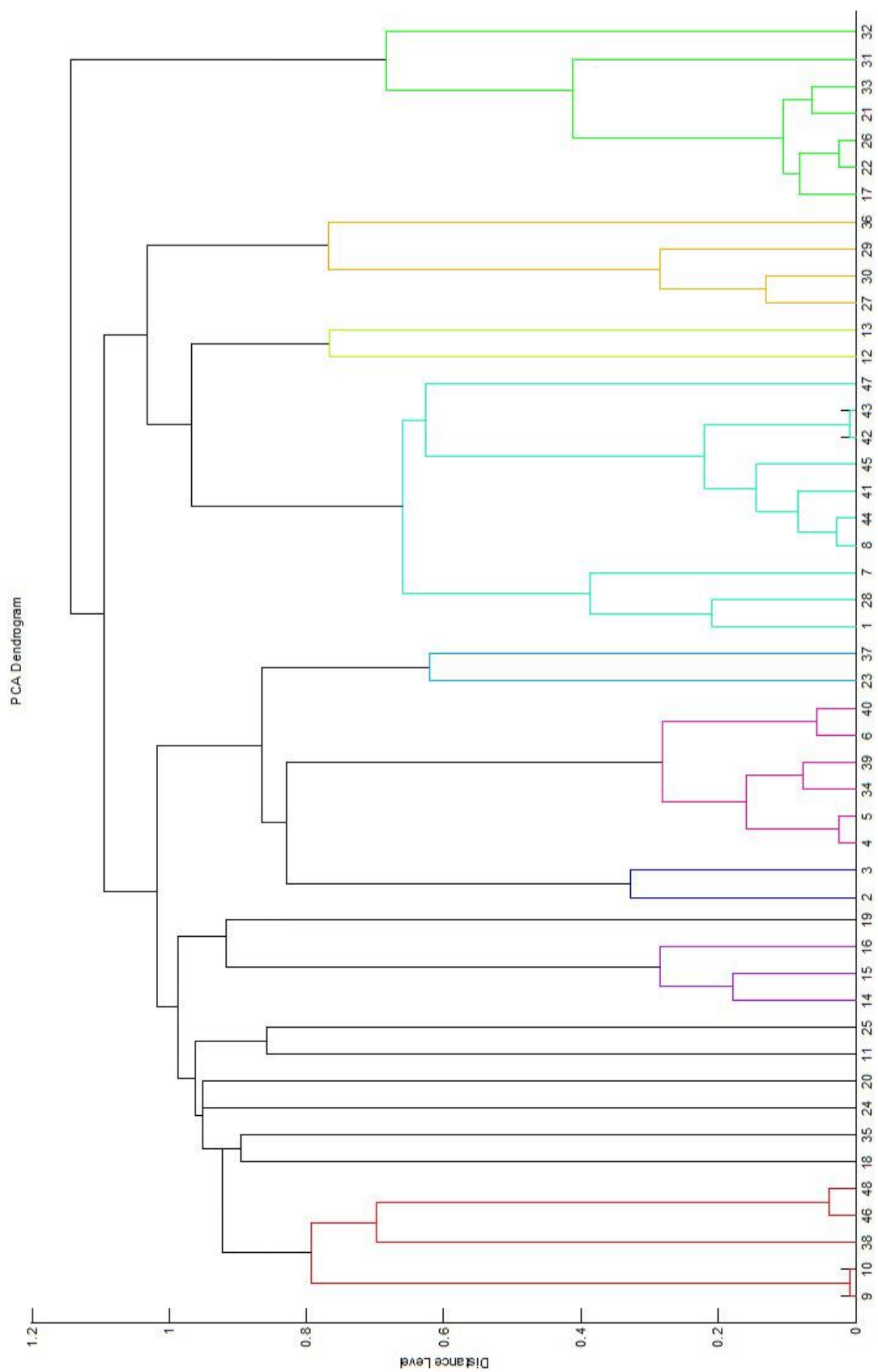
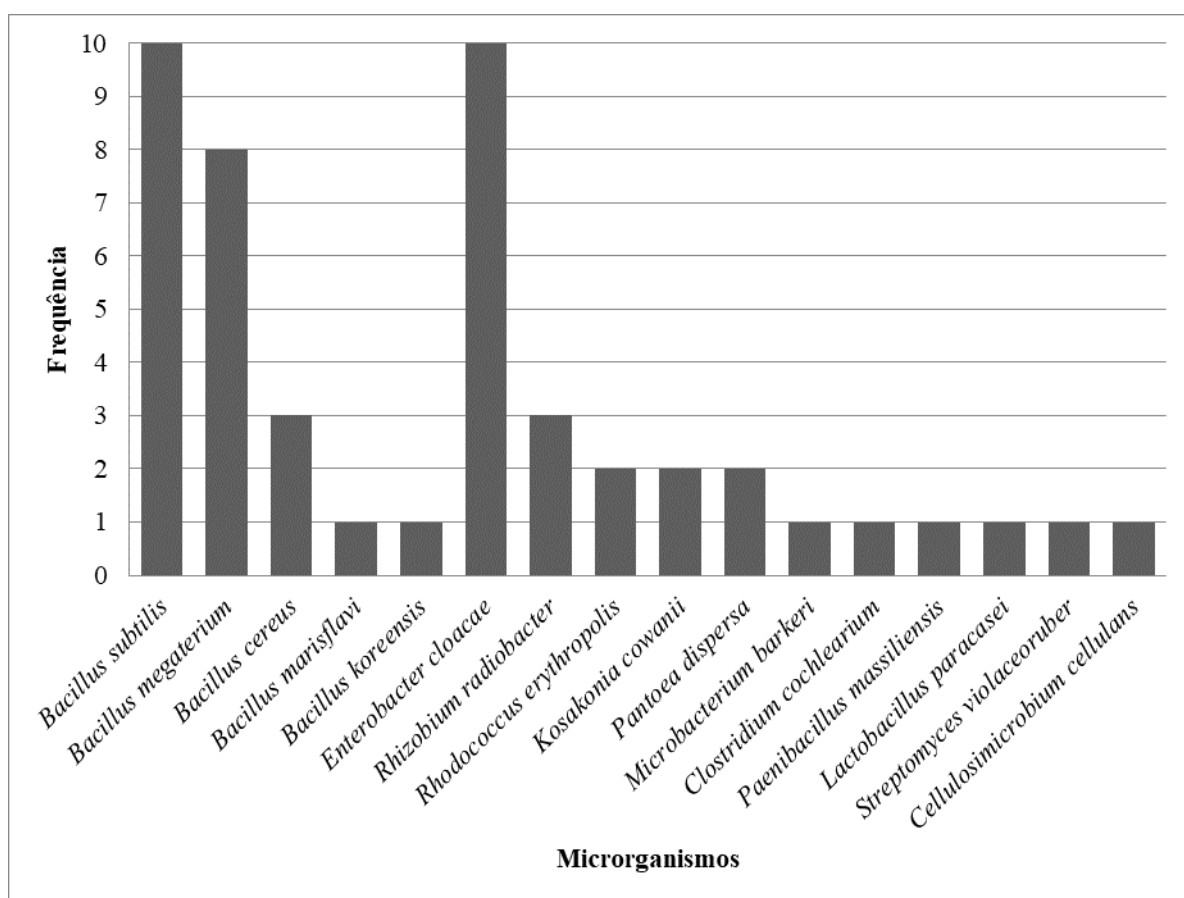


Figura 3 – Número de bactérias endofíticas identificadas pela técnica MALDI-TOF MS.



O resultado dos testes de coloração de gram, oxidase, catalase, motilidade e esporulação para os 48 isolados identificados previamente pela técnica de MALDI-TOF MS estão presentes na tabela 3.

Tabela 3 – Identificação das bactérias isoladas das raízes de alho.

Código	Identificação MALDI-TOF MS	Score	Gram	Oxidase	Catalase	Motilidade	Esporulação
M1A	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.163	-	-	+	+	-
M1B	<i>Bacillus subtilis</i>	1.705	+	-	+	+	+
M1C	<i>Bacillus subtilis</i>	1.587	+	-	+	+	+
M2A	<i>Bacillus subtilis</i>	1.905	+	-	+	+	+
M2B	<i>Bacillus subtilis</i>	2.044	+	-	+	+	+
M2C	<i>Bacillus subtilis</i>	2.016	+	-	+	+	+
M3A	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.285	-	-	+	+	-
M3B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.206	-	-	+	+	-
M3C	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.828	-	-	+	+	-
M3D	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.851	-	-	+	+	-

Continua

M4A	<i>Bacillus marisflavi</i>	2.186	+	-	+	+	+
M4B	<i>Pantoea dispersa</i>	2.344	-	-	+	-	-
M4C	<i>Pantoea dispersa</i>	1.782	-	-	+	-	-
M5A	<i>Bacillus cereus</i>	2.058	+	-	+	+	+
M5B	<i>Bacillus cereus</i>	2.251	+	-	+	+	+
M5C	<i>Bacillus cereus</i>	2.258	+	-	+	+	+
M6A	<i>Bacillus megaterium</i>	2.175	+	-	+	+	+
M7A	<i>Microbacterium barkeri</i>	2.414	+	-	-	-	-
M7B	<i>Bacillus subtilis</i>	1.675	+	-	+	+	+
M7C	<i>Bacillus megaterium</i>	1.318	+	-	+	+	+
M8A	<i>Bacillus megaterium</i>	2.179	+	-	+	+	+
M8B	<i>Bacillus megaterium</i>	2.202	+	-	+	+	+
M9A	<i>Bacillus subtilis</i>	1.675	+	-	+	+	+
M9B	<i>Clostridium cochlearium</i>	1.377	+	-	-	+	+
M10A	<i>Bacillus koreensis</i>	1.272	+	-	+	+	+
M11A	<i>Bacillus megaterium</i>	2.215	+	-	+	+	+
M12A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.688	-	+	+	+	-
M12B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.106	-	-	+	+	-
M12C	<i>Rhizobium radiobacter</i>	2.351	-	+	+	+	-
M12D	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.765	-	+	+	+	-
M13A	<i>Bacillus megaterium</i>	1.869	+	-	+	+	+
M13B	<i>Bacillus megaterium</i>	1.783	+	-	+	+	+
M13C	<i>Bacillus megaterium</i>	2.166	+	-	+	+	+
M14A	<i>Bacillus subtilis</i>	2.014	+	-	+	+	+
M14B	<i>Paenibacillus massiliensis</i>	1.955	+	-	+	+	+
M14C	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1.177	+	-	-	-	-
M15A	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	1.633	+	-	-	-	-
M16A	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	2.076	+	-	+	-	-
M16B	<i>Bacillus subtilis</i>	1.923	+	-	+	+	+
M16C	<i>Bacillus subtilis</i>	1.989	+	-	+	+	+
M17A	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.091	-	-	+	+	-
M17B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.204	-	-	+	+	-
M17C	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.221	-	-	+	+	-
M18A	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.123	-	-	+	+	-
M18B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.151	-	-	+	+	-
M19A	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1.441	+	-	+	-	-
M19B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.073	-	-	+	+	-
M19C	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1.931	+	-	+	-	-

Legenda: M: Morfotipo. Scores >1.7 confiável a nível de gênero; >2.0 confiáveis a nível de espécie.

Dos 48 isolados identificados pela técnica MALDI-TOF MS, 31 isolados são gram positivos. Em relação ao teste de oxidase, apenas as bactérias do gênero *Rhizobium* apresentaram oxidase positiva. De acordo com o teste de catalase, a maioria dos isolados apresentaram catalase positiva, com exceção das espécies *M. barkeri*, *C. cochlearium*, *L. paracasei* e *S. violaceoruber*. Apenas a espécie *R. radiobacter* apresentou resultado positivo tanto para o teste de catalase quanto para o teste de oxidase.

Grande parte dos isolados apresentaram motilidade, apenas para as espécies *P. dispersa*, *M. barkeri*, *L. paracasei*, *S. violaceoruber*, *C. cellulans* e *R. erythropolis* observou-se um resultado negativo para esse teste. Somente os isolados dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* apresentaram a capacidade de formação de esporos.

Para a avaliação da capacidade de promoção de crescimento vegetal das bactérias isoladas realizou-se o teste de produção de auxina e fixação de nitrogênio (Tabela 4). Todos os isolados produziram auxina. Os isolados apresentaram produção de auxina variando entre 3,08 e 8,23 µg/mL, sendo o melhor resultado foi observado nos isolados *L. paracasei* (M14C), *E. cloacae* (M19B) e *B. cepacia* (CCMA 0056). Não houve diferença significativa na quantidade de AIA produzida por esses isolados e o controle positivo (*Azospirillum brasilense*).

Aproximadamente 60 % dos isolados foram capazes de fixar nitrogênio. Exceto espécies *K. cowanii*, *R. erythropolis*, *S. violaceoruber*, *C. cellulans*, *C. cochlearium*, *M. barkeri*, *B. cereus*. Alguns isolados como M9A, M13C, M14A, M14B, M14C, M16C, M18B e M19B, se destacaram em relação a capacidade de fixar nitrogênio, apresentaram formação de halo no meio NFb em até 48 horas. Para os diferentes isolados das espécies *B. subtilis*, *B. megaterium*, *E. cloacae*, *P. dispersa*, foi observado resultados positivos e negativos para a fixação de nitrogênio.

Apesar do maior número de isolados obtidos a partir do meio LB, as bactérias isoladas no meio NFb foram as que apresentaram maior produção de AIA e maior número de isolados capazes de fixar nitrogênio atmosférico.

Tabela 4 – Produção de auxina e fixação de nitrogênio por bactérias isoladas da raiz de alho.

Código	Identificação MALDI-TOF MS	AIA (µg/mL)	Fixação de nitrogênio
M1A	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,82c	+
M1B	<i>Bacillus subtilis</i>	3,38c	+
M1C	<i>Bacillus subtilis</i>	3,08c	+
M2A	<i>Bacillus subtilis</i>	3,10c	+
M2B	<i>Bacillus subtilis</i>	3,97c	-
M2C	<i>Bacillus subtilis</i>	3,47c	+
M3A	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,43c	-
M3B	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,05c	+
M3C	<i>Kosakonia cowanii</i>	3,70c	-
M3D	<i>Kosakonia cowanii</i>	3,13c	-
M4A	<i>Bacillus marisflavi</i>	4,87c	+
M4B	<i>Pantoea dispersa</i>	4,42c	-
M4C	<i>Pantoea dispersa</i>	3,75c	+
M5A	<i>Bacillus cereus</i>	3,83c	-
M5B	<i>Bacillus cereus</i>	3,48c	-

Continua

M5C	<i>Bacillus cereus</i>	3,90c	-
M6A	<i>Bacillus megaterium</i>	3,83c	-
M7A	<i>Microbacterium barkeri</i>	3,48c	-
M7B	<i>Bacillus subtilis</i>	3,72c	-
M7C	<i>Bacillus megaterium</i>	3,78c	-
M8A	<i>Bacillus megaterium</i>	3,87c	-
M8B	<i>Bacillus megaterium</i>	3,95c	-
M9A	<i>Bacillus subtilis</i>	4,33c	+
M9B	<i>Clostridium cochlearium</i>	3,68c	-
M10A	<i>Bacillus koreensis</i>	4,37c	+
M11A	<i>Bacillus megaterium</i>	3,25c	-
M12A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	4,23c	+
M12B	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,05c	-
M12C	<i>Rhizobium radiobacter</i>	5,10c	+
M12D	<i>Rhizobium radiobacter</i>	4,52c	+
M13A	<i>Bacillus megaterium</i>	3,93c	+
M13B	<i>Bacillus megaterium</i>	3,38c	+
M13C	<i>Bacillus megaterium</i>	5,02c	+
M14A	<i>Bacillus subtilis</i>	6,57b	+
M14B	<i>Paenibacillus massiliensis</i>	4,55c	+
M14C	<i>Lactobacillus paracasei</i>	8,18a	+
M15A	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	3,33c	-
M16A	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	3,23c	-
M16B	<i>Bacillus subtilis</i>	4,17c	+
M16C	<i>Bacillus subtilis</i>	3,95c	+
M17A	<i>Enterobacter cloacae</i>	6,80b	-
M17B	<i>Enterobacter cloacae</i>	6,22b	-
M17C	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,30c	-
M18A	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,83c	+
M18B	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,77b	+
M19A	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	5,55b	-
M19B	<i>Enterobacter cloacae</i>	7,97a	+
M19C	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	6,33b	-
CCMA 0056	<i>Burkholderia cepacia</i>	8,23a	+
CCMA 1285	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,88c	+
CCMA 1291	<i>Azospirillum brasilense</i>	4,42c	+
Controle +	<i>Azospirillum brasilense</i>	7,72a	+

Legenda: M: Morfotipo. AIA: Ácido Indol Acético. Fixação de N: medida pela presença da película de crescimento em meio semissólido sem nitrogênio NFb como (+) positivo e (-) negativo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$).

Dos 51 isolados utilizados, apenas 19 (37,3%) demonstraram capacidade de solubilizar fosfato (Tabela 5). Destes, nove isolados (47,4%) sendo *E. cloacae*. Os índices de solubilização variaram entre 1,3 e 7,4. O melhor resultado foi obtido pelo isolado CCMA 0056, com valor máximo de IS 7,4 ao décimo segundo dia. Os isolados M13C e M19B, M9A, M17A, M18A, M18B e CCMA 1285 apresentaram alto índice de solubilização (IS > 4,0). Os isolados M9A, M13C, M18B e M19B exibiram alto índice de solubilização (IS > 4,0) desde o primeiro tempo analisado (3º dia).

Tabela 5 – Índice de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados da raiz do alho.

Código	Identificação MALDI-TOF MS	Índice de Solubilização (IS)			
		3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia
M1A	<i>E. cloacae</i>	2,1eB	2,8dA	3,0fA	3,3fA
M2A	<i>B. subtilis</i>	1,8eA	1,9eA	2,0hA	2,0hA
M3A	<i>E. cloacae</i>	1,5eA	1,6fA	1,6iA	1,6iA
M3B	<i>E. cloacae</i>	1,3eB	1,3fB	1,4iB	2,0iA
M4B	<i>P. dispersa</i>	3,0cA	3,3dA	3,4fA	3,4fA
M6A	<i>B. megaterium</i>	3,0cB	4,0cA	4,2eA	4,2eA
M9A	<i>B. subtilis</i>	4,4bB	4,6bB	5,1cA	5,1cA
M12A	<i>R. radiobacter</i>	2,6dA	2,6dA	2,6gA	2,6gA
M13C	<i>B. megaterium</i>	3,7cB	3,9cB	4,0eB	5,9bA
M14A	<i>B. subtilis</i>	2,1eA	2,4dA	2,4gA	2,4gA
M17A	<i>E. cloacae</i>	3,4cA	4,6bB	5,1cA	5,1cA
M17B	<i>E. cloacae</i>	2,1eB	2,6dA	2,8gA	2,8gA
M18A	<i>E. cloacae</i>	3,9cB	4,0cB	4,6dA	4,8cA
M18B	<i>E. cloacae</i>	3,7cB	4,8bA	4,9cA	4,9cA
M19A	<i>R. erythropolis</i>	3,2cB	3,8cA	3,9eA	3,9eA
M19B	<i>E. cloacae</i>	4,7aB	5,4aA	5,6bA	5,6bA
M19C	<i>R. erythropolis</i>	2,1eA	2,1eA	2,1hA	2,1hA
CCMA 0056	<i>B. cepacia</i>	3,2cD	4,4bC	6,2aB	7,4aA
CCMA 1285	<i>E. cloacae</i>	1,8eC	2,5dB	4,6dA	4,6dA
Controle +	<i>B. cenocepacia</i>	2,8dB	2,9dB	3,8eA	4,0eA

Legenda: NS: Não houve solubilização. Graus de solubilização: baixa (IS <2,00), intermediário (2,00<IS<4,00) e alta (IS>4,0). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05), sendo comparadas letras minúsculas em colunas e maiúsculas em linhas.

4 DISCUSSÃO

A identificação de bactérias com base no perfil MALDI-TOF MS dispõe de várias vantagens que variam de alta produtividade, rapidez, facilidade de uso e baixo custo por teste (DEC et al., 2014; VITHANAGE et al., 2014). Nesse sentido, o método MALDI-TOF-MS se apresentou como método acessível, sustentável e robusto, permitindo uma identificação confiável dos microrganismos. No entanto, é necessária certa cautela no preparo das amostras para identificação por esta técnica, pois o campo de aplicação está restrito a cultura fresca (porque o banco de dados disponível comercialmente foi construído com culturas frescas), além de uma discriminação difícil, mas não impossível, de microrganismos filogeneticamente próximos e finalmente um conteúdo do banco de dados de perfis de MS relativamente restrito a cepas de interesse clínico (PAAUW et al., 2015).

Todos os isolados obtidos apresentaram a capacidade de produzir AIA. Os valores de AIA observados estão de acordo com os encontrados em outros estudos, nos quais também foi observada a variação na capacidade de produção de AIA pelas estirpes bacterianas (PEDRINHO et al. 2010; CHAVES et al., 2015). Cada isolado apresenta

diferentes níveis de produção de auxina, dependendo do modo de cultivo e da estirpe utilizada (CASSÁN et al., 2014).

Assim como a produção de AIA, os isolados variaram de acordo com sua capacidade de fixar nitrogênio, inclusive em isolados identificados como sendo da mesma espécie. Portanto, podemos presumir que essa habilidade varia de acordo com a estirpe microbiana, podendo dentro da mesma espécie de microrganismo existir cepas fixadoras ou não de nitrogênio.

O nitrogênio é um macronutriente essencial para as plantas, entretanto, sua assimilação é limitada, requerendo a transformação para uma forma combinada (NH_4 e NO_3) que facilite sua assimilação e juntamente com carbono e hidrogênio. Além de sua participação na composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, este macronutriente tem papel fundamental na síntese de clorofila, que por sua vez, influencia diretamente no aumento de massa vegetal (TAIZ et al., 2017). Plantas com deficiência desse elemento apresentam-se atrofiadas e as folhas com coloração entre verde pálido e amarela, e relaciona-se com a participação do N na estrutura da molécula de clorofila (CARVALHO et al., 2003). Esta relação é atribuída, principalmente, ao fato de que 50 a 70% do N total das folhas serem integrantes de enzimas que estão associadas aos cloroplastos (CHAPMAN & BARRETO, 1997).

De acordo com os resultados para o teste de fixação biológica de nitrogênio, destacaram-se isolados *Bacillus* sp. grupo e *Enterobacter cloacae*, com capacidade de fixar nitrogênio *in vitro* em menos de 48 h. A utilização de microrganismos na disponibilização de nitrogênio em sua forma assimilável para as plantas tem grande impacto ambiental, pois a aplicação de adubação nitrogenada nas áreas agrícolas atinge o meio aquático de três maneiras: drenagem, lixiviação e escoamento (KORKMAZ, 2017; SONMEZ et al., 2008).

O gênero *Bacillus* foi o mais frequente entre os isolados identificados. Bactérias deste grupo são capazes de formar esporos e sobreviver em condições ambientais extremas, como elevada temperatura, baixo pH, sendo ideais para inoculação em campo (CUTTING, 2011). *B. subtilis* caracteriza-se por ser Gram-positivo, produtor de endósporos resistentes a fatores físicos e químicos, pela produção de enzimas hidrofílicas extracelulares que degradam polissacarídeos, antibióticos lipopeptídicos. *B. subtilis* também é conhecido por promover o desenvolvimento de plantas, em culturas de alho, por exemplo (RAGAZZO-SÁNCHEZ et al., 2011).

B. subtilis promove o crescimento vegetal através do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Araujo (2008) mostra que sementes de algodão, milho e soja inoculadas com *B. subtilis* promoveram a emergência das plântulas. Assim, têm-se a diminuição do tempo no campo, e, conseqüentemente, redução do tempo de contato com patógenos presentes no solo e no ambiente externo nos primeiros estágios da planta (LANNA FILHO et al., 2010). A partir destas características, esta espécie se mostra uma promissora BPCP também para cultura do alho.

Azri et al. (2018) testando cepas de *Bacillus* isoladas de raízes de dendê verificaram que elas possuíam potencial promotor de crescimento vegetal, sendo positivas para os testes *in vitro* de produção de AIA, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Ambreetha et al. (2018) constataram que estirpes de *Bacillus*, em condições controladas, aumenta o acúmulo de AIA em raízes de arroz. Estes autores relatam o aumento no número de raízes laterais, espessura da parede, aumento do volume, área e diâmetro da raiz e diminuição do comprimento da raiz em comparação ao controle não inoculado.

Sarawaneeyaruk et al. (2018) afirmam que cepas de *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* isoladas de diferentes solos contaminados com metais pesados possuem a capacidade de promover o crescimento de plantas em meios de cultivo com altas concentrações de NH_4 e íons de ferro.

O segundo gênero com maior frequência presente na raiz de alho foi *Enterobacter*. Atualmente, este gênero é um dos maiores grupos da família *Enterobacteriaceae*, com 20 espécies já descritas e está em rápida expansão, com 50% das descrições de novas espécies ocorridas nos últimos 20 anos (BRADY et al., 2013). O gênero *Enterobacter* abrange uma vasta gama de bactérias colonizando diferentes ambientes, como a rizosfera, plantas, animais e humanos. Algumas espécies são promotoras de crescimento vegetal por meio dos diferentes mecanismos diretos e indiretos (RAMESH et al., 2014). Estes gêneros de bactérias são relatados em associação com diversas plantas leguminosas e não-leguminosas, como os isolados de *E. cloacae* e *Pantoea* sp. (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015; ANTUNES, 2016). Dos Santos et al. (2014) verificaram que em condições ideais de umidade do solo a combinação de *Bacillus* sp. e *Enterobacter cloacae* pode incrementar o crescimento de girassol pelo maior acúmulo de solutos orgânicos.

Em relação ao agrupamento de isolados de *Enterobacteriaceae* são destacadas bactérias que apresentaram similaridade a *Kosakonia oryzae*. Em 2013, dois gêneros pertencentes ao grupo *Enterobacteriaceae* também foram separados: *Pluralibacter* (*P. gergoviae* e *P. pyrinus*) e *Kosakonia* (*K. cowanii*, *K. radicincitans*, *K. oryzae* e *K. arachidis*), que agrupavam bactérias antes classificadas a *Enterobacter* (BRADY et al., 2013; CHEN et al., 2016; KÄMPFER et al., 2016).

Dentre as espécies agrupadas no gênero *Kosakonia* são destacados relatos dessas bactérias colonizando gramíneas de forma endofítica e do potencial para a promoção do crescimento vegetal por diferentes mecanismos, como a fixação de nitrogênio (CHEN et al., 2016; KÄMPFER et al., 2016). Espécies do gênero *Kosakonia* são descritas promovendo o crescimento das plantas, através da fixação biológica de nitrogênio (BRADY et al., 2013). Meng et al. (2015) encontrou bactérias do gênero *Kosakonia* associada ao arroz apresentando propriedades promotoras do crescimento de plantas, principalmente pela fixação do nitrogênio atmosférico. Em um trabalho recente, Berger et al. (2017) isolaram *K. radicincitans* de trigo e além de ter promovido o crescimento em tomate também acelerou a floração e o amadurecimento do fruto, além de torna-los mais saborosos.

Bactérias do gênero *Azospirillum* representam as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas mais bem descritas. O efeito promotor de crescimento de plantas de *Azospirillum brasilense* é causado principalmente pela produção do fitormônio ácido indole-3-acético (AIA) (DOBBELAERE et al., 1999). Van Puyvelde et al. (2011) ao observar mudanças em diferentes transcriptomas concluíram que AIA é uma molécula sinalizadora em *A. brasilense*. Segundo os autores, a bactéria quando exposta ao AIA se adapta à rizosfera vegetal, alterando seu arsenal de proteínas de transporte e de superfície celular. Além disso, muitos fatores de transcrição também tiveram a regulação alterada, indicando que a maquinaria reguladora da bactéria mudou, sugerindo que o AIA fornece um meio de comunicação entre a bactéria e a planta.

Prinsen et al. (1993) detalharam três rotas biossintéticas para a produção de AIA em *A. brasilense*: rota do indole-3-acetamida (AIM), uma segunda dependente de triptofano e uma terceira rota, *trp*-independente. Este foi o primeiro trabalho a fornecer dados sobre uma rota independente de triptofano na síntese de AIA em bactérias. A via dependente do triptofano é a mais comum. Microrganismos dos gêneros *Pantoea*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, e *Pseudomonas* produzem AIA por essa via (PATTEN & GLICK, 1996; TSAVKELOVA et al., 2006).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos, estes aumentam a disponibilidade do fósforo, que é considerado o macronutriente mais limitante para o crescimento e a produção agrícola em condições brasileiras (RAIJ, 1991). Por isso a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato ou o manejo da população destes microrganismos em culturas agronomicamente importantes, traz grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, melhorando o suprimento de fósforo (SOUCHIE et al., 2005).

Apesar dos resultados *in vitro*, é necessário levar em consideração fatores como a seleção das BPCP adequadas baseando-se na planta hospedeira, alvo, tipo de solo, comunidades microbianas selvagens (autóctones) e condições ambientais para o processo de desenvolvimento de inoculantes, pois a maioria dos microrganismos é influenciada pelas interações entre as raízes das plantas e o solo circundante, normalmente com uma microbiota bastante estabelecida em condições naturais (BIRCH & KAMOUN, 2000; BERG & SMALLA, 2009).

5 CONCLUSÃO

Bactérias do gênero *Bacillus* e *Enterobacter* são predominantes na raiz de alho, e apresentam maior potencial como BPCP.

A capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio analisadas em condições *in vitro* indicam que os isolados M9A (*Bacillus subtilis*), M13C (*Bacillus megaterium*), M18B (*Enterobacter cloacae*) e M19B (*Enterobacter cloacae*) são possíveis candidatos para aplicação na promoção de crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AKINTOKUN, A. K. et al. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. **International Journal of Soil Science**, v. 2, n. 4, p. 301-307, 2007.
- ALI, S. et al. Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1139-1144, 2012.
- AMBREETHA, S. et al. Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. **Rhizosphere**, v. 5, p. 57-66, 2018.
- ANDRADE, F. M. **Seleção De Bactérias Promotoras De Crescimento E Inoculação Em Morangueiro**. Dissertação de mestrado. Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, 2017.
- ANTUNES, G. R. **Diversidade e eficiência na promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do Semiárido**. Dissertação de mestrado. Petrolina-PE, Universidade Federal do Vale do São Francisco. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
- ARAUJO, F. F. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.
- AZRI, M. H. et al. An endophytic *Bacillus* strain promotes growth of oil palm seedling by fine root biofilm formation. **Rhizosphere**, v. 5, p. 1-7, 2018.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BERGER, B. et al. The plant growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 14, p. 4865-4871, 2017.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BIRCH, P. R. J; KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. **A Trends Guide**, v. 12, n. 2000, p. 77-82, 2000.

- BRADY, C. et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis MLSA. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39 p. 309-19, 2013.
- CARVALHO, M. D. et al. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 445-450, 2003.
- CASSÁN, F. et al. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.
- CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 4, p. 557-562, 1997.
- CHAVES, V. A. et al. Initial Development of Two Sugarcane Varieties Inoculated with Diazotrophic Bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595-1602, 2015.
- CHEN, C. et al. Biological control potential and population dynamics of endophytic bacteria in a cotton/*Fusarium* wilt system. In: **Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proceedings of the 3rd International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Adelaide, Australia**. 1994. p. 7-11.
- CHEN, Y. et al. Survival strategies of the plant-associated bacterium *Enterobacter* sp. strain EG16 under cadmium stress. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 03689-15, 2016.
- COUTINHO, B. G. et al. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 1, p. 10-21, 2015.
- CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.
- DEC, M. et al. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. **Research in microbiology**, v. 165, n. 3, p. 190-201, 2014.
- 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, 1999.
- DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.
- DOS SANTOS, J. F. 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.

- DOTY, S. L. et al. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. **Symbiosis**, v. 47, n. 1, p. 23-33, 2009.
- FERNANDES-JÚNIOR, P. I. et al. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 993-1002, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a program for statistical analysis and teaching. **Rev Symposium**.v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Viçosa, MG: Editora UFV**, 2008.
- FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 4, n. 5, p. 732, 2009.
- GLICK, B. R. **Beneficial plant-bacterial interactions**. Heidelberg: Springer, 2015.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric Estimation of Inodoleacetic Acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1951.
- HARDOIM, P. R. et al. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.
- KÄMPFER, P. et al. *Kosakonia pseudosacchari* sp. nov., an endophyte of *Zea mays*. **Systematic and applied microbiology**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2016.
- KORKMAZ, K. **Tarım Girdi Sisteminde Azot ve Azot Kirliliği**. 2017. Disponível em <http://www.ziraat.ktu.edu.tr/tarim_girdi.htm> Acesso em 11 julho 2018.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- LANNA FILHO, R. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.
- LOACES, I. et al. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 606-618, 2011.
- LUO, S. et al. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1745-1753, 2012.
- MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1057-1062, 2005.
- MARASCO, R. et al. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e48479, 2012.

- MENEZES JÚNIOR, F. O. G. Cultivo in vitro do alho visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 158-167, 2011.
- MENG, X. et al. Draft genome sequence of rice endophyte-associated isolate *Kosakonia oryzae* KO348. **Genome announcements**, v. 3, n. 3, p. e00594-15, 2015.
- MITTER, B. et al. Genome analysis, ecology, and plant growth promotion of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Molecular microbial ecology of the rhizosphere**, v. 1, p. 865-874, 2013.
- MOURA, A. P. et al. Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho. Brasília: **Embrapa hortaliças**, p. 1-12, 2013.
- NARULA, S. et al. Beneficial traits of endophytic bacteria from field pea nodules and plant growth promotion of field pea. **Journal of Food Legumes**, v. 26, n. 3and4, p. 73-79, 2013.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.
- PAAUW, A. et al. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 4-5, p. 446-452, 2015.
- PANDYA, M. et al. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. **Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 80-89, 2015.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.
- PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Instituto Agronômico de Campinas, v. 69, n. 4, 2010.
- PRINSEN, E. et al. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 609-609, 1993.
- RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. et al. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. **Revista Chapingo. Serie horticultura**, v. 17, n. SPE1, p. 5-11, 2011.
- RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba (Brasil), 1991.
- 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**, v. 3, n. 1, p. 53-66, 2014.
- RASHID, S. et al. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied soil ecology**, v. 61, p. 217-224, 2012.

- RAZA, W. et al. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Scientific reports**, v. 6, p. 24856, 2016.
- SAINI, R. et al. Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 1, p. 74-81, 2015.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
- SARAWANEEYARUK, S. et al. Enhancing plant growth under municipal wastewater irrigation by plant growth promoting rhizospheric *Bacillus* spp. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.
- SILVA, M. 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**, v. 36, n. 4, 2012.
- SÖNMEZ, İ. et al. Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri. **Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi**, v. 25, n. 2, p. 24-34, 2008.
- SOUCHIE, E. L. et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 26, 2014.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.2, p.117-126, 2006.
- VAN PUYVELDE, S. et al. Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. **Microbial ecology**, v. 61, n. 4, p. 723-728, 2011.
- VITHANAGE, N. R. et al. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 26-38, 2014.

[Artigo a ser submetido à publicação no periódico Scientia Horticulturae
(ISSN: 0304-4238), 2018]

ENDOFYTIC BACTERIA AS GROWTH PROMOTERS OF GARLIC (*Allium sativum* L.) MERISTEM IN VITRO CULTIVATION

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are part of the resident population of plants as epiphytic or endophytic. They can stimulate plant growth and productivity through direct and/or indirect effects. Garlic has great national economic importance, but to obtain success in relation to its cultivation, a preponderant factor is the use of matrix free of viruses. The present work aimed to inoculate PGPB in garlic meristem in in vitro culture. Four previously isolated bacteria from roots of garlic and three other strains from the Collection of Culture of Microorganisms of Agricultural Microbiology - UFLA (CCMA 0056, CCMA 1285, CCMA 1291) were used. Phytotechnical analysis, chlorophyll content and colonization evaluation were performed. There was a positive difference between inoculated plants and uninoculated control. We also observed that the bacteria had the ability to colonize at different levels the surface and interior of the plants. CCMA 0056 and M19B stand out among the isolates tested, being indicated their use as PGPB.

Keywords: Tissue Culture, Scanning Electron Microscopy, *Bacillus*, PGPB.

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE MERISTEMA DE ALHO (*Allium sativum* L.) NO CULTIVO *IN VITRO*

RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas, estimulando seu crescimento e produtividade através de efeitos diretos e/ou indiretos. O alho tem grande importância econômica nacional, porém, para obtenção de sucesso em relação ao seu cultivo, um fator preponderante para o sucesso é a utilização de matrizes isentas de víruses. O presente trabalho objetivou-se em inocular BPCP em meristemas de alho no cultivo *in vitro*. Foram utilizadas quatro bactérias previamente isoladas de raiz de alho, e mais três cepas da Coleção de Cultura de Microrganismos da Microbiologia Agrícola – UFLA (CCMA 0056, CCMA 1285, CCMA 1291). Foram feitas análises fitotécnicas, teores de clorofila e avaliação da colonização por microscopia eletrônica de varredura. Houve diferença significativa positiva entre as plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Também pode-se observar que as bactérias apresentaram a capacidade de colonizar em diferentes níveis a superfície e interior das plantas. Entre os isolados testados, destacam-se CCMA 0056 e M19B, indicados para utilização como BPCP.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos, Microscopia Eletrônica de Varredura, *Bacillus*, BPCP.

1 INTRODUCTION

The national agricultural scenario has been outstanding worldwide due to high productivity in several crops, allowing to compete with developed countries with more advanced technologies (BOKHTIAR & SAKURAI, 2005).

In order to obtain such results, a large number of pesticides have been used to control diseases and pests, as well as highly soluble fertilizers. These applications negatively influence soil quality and contribute to environmental pollution (AKTAR et al., 2009). In order to minimize the deleterious effects of conventional farming techniques, seeking environmental preservation and increased productivity, methods based on microbial inoculation are gaining more visibility (KARTHIK et al., 2016; AKTAR et al., 2009).

In order to improve the quality of the soil, it is necessary to improve soil quality (KHAN et al., 2013, KARTHIK et al., 2016 and PURI et al., 2016). Thus, the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) is done as an alternative in the improvement of agricultural production systems (KARTHIK et al., 2016).

The main characteristic of PGPB is to favor plant development through direct and / or indirect mechanisms. These mechanisms can be exploited to the benefit of a more sustainable agriculture and of less environmental impact. This is due to the emerging demand for a decrease in the dependence of chemical fertilizers, the need to develop sustainable agriculture, and the demand for consumption of healthier foods (BULGARELLI et al., 2013).

Among the various plants used by man in food, garlic (*Allium sativum* L.) is one of the crops whose national economic importance has increased considerably in recent years. Until April 2017, the area planted with garlic in Brazil was 11,281 hectares, with a consequent production of 124,471 tons, with Minas Gerais being the main producer, representing 36.1% of the total production (BRAZIL, 2017).

A limiting factor for garlic cultivation is the need for virus-free matrices, which are obtained by in vitro meristem cultivation (VIEIRA et al, 2014). The use of PGPB can be an efficient alternative in reducing costs in the production of in vitro seedlings from meristem, because the seedlings would be available to the field in less time. In addition, the use of these bacteria can provide plants that are more resistant to attack by pathogens and act to promote plant growth, leading to a reduction in the use of agricultural inputs (OLIVEIRA et al, 2014; MENEZES JÚNIOR, 2011).

Thus, the search for and development of alternatives to conventional agriculture is necessary in order to increase productivity. In this way, the use of PGPB can lead to an increase in productivity and reduction of costs for the producer. The objective of this work

was to evaluate garlic root endophytic bacteria as growth promoters in garlic plants using the in vitro meristem culture technique.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganisms

From the results in previous experiments, seven isolates were selected to evaluate the growth promotion potential of garlic meristems (Table 1). As a positive control, the strain Ab-V5 *Azospirillum brasilense* was used.

Table 1 - Strains belonging to the CCMA used.

Code	Species	Geographical origin	Substrate
M9A	<i>Bacillus subtilis</i>	Lavras, MG, Brazil	Garlic Root
M13C	<i>Bacillus megaterium</i>	Lavras, MG, Brazil	Garlic Root
M18B	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lavras, MG, Brazil	Garlic Root
M19B	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lavras, MG, Brazil	Garlic Root
CCMA 0056	<i>Burkholderia cepacia</i>	Passos, MG, Brazil	Fruit (<i>Cerrado</i>) <i>Pimenta-do-Mato</i>
CCMA 1285	<i>Enterobacter cloacae</i>	Fazenda Daterra, Patrocínio-MG, Brazil	Coffee fermentation water
CCMA 1291	<i>Azospirillum brasilense</i>	EMBRAPA Londrina- PR, Brazil	-

2.2 Growth Curve and Standardization of Inoculum

The growth curve of the microorganisms was selected in order to select the concentration of the microorganism that promoted better interaction with the plant. The inocula were transferred to 10 mL of nutrient broth (CN) (peptone 5.0 g, L⁻¹, meat extract 3.0 g L⁻¹) and incubated at 28 ° C for 24 h. After the incubation period, 2 mL of the culture was transferred to 100 mL of CN. After 24 h of incubation at 37 ° C the absorbance was measured at 600 nm. From the optical density (OD) obtained, dilution of the inoculum to OD of 0.01 in 300 mL of CN was performed.

Monitoring of bacterial growth was done by means of absorbance readings of the inoculum and plating of microdrops every hour, from time zero to time 24 hours. In the exponential growth phase, the readings and plating were performed every 30 minutes. At each

time, the inoculum was plated in serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-8} in NA medium and incubated at 28°C for 18 hours for later counting.

Microbial growth curves were constructed from the absorbance and the total cell count in relation to time, obtaining equations that were used to calculate the population of the inoculum.

The inocula were prepared separately, grown in nutrient broth at 28°C for 24 h at 120 rpm, and the inoculum concentrations of 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 and 10^8 cells / mL^{-1} were used.

2.3 In vitro Meristem Production and Culture

The experiment was carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Agriculture, Federal University of Lavras - UFLA.

Garlic bulbs of cv. "Giant Purple" coming from a farm of Espirito Santo. The garlic was vernalized for 45 days to overcome dormancy. The bulbs were immersed in distilled water with two drops of neutral detergent for one minute. Immediately afterwards, immersed in 70% ethyl alcohol for one minute and in 50% sodium hypochlorite solution for 20 minutes under constant stirring. The disinfectants were removed by triple washing in sterile distilled water. Bulbs were sectioned near the meristematic region and disinfested again with sodium hypochlorite (same concentration) for 15 minutes. Finally, the meristem was excised (0.1 to 0.3 mm) using scalpel and a stereomicroscope in a flow chamber.

The meristems were cultured in MS agar medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962). The meristem was incubated without the presence of bacteria for a period of 15 days in a growth room at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with photoperiod of 16 h and $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light intensity.

After the incubation period, the uniform meristems were inoculated by immersion in bacterial suspension at different inoculum concentrations (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 and 10^8 cells / mL^{-1}) for 30 min under shaking at 120 rpm at 28°C (PEDRAZA et al., 2010). The meristems were dried for five seconds and immediately transferred to the semi-solid MS medium. The meristems were randomly distributed in the growth room at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with photoperiod of 16 h and $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light intensity. After 30 days of inoculation, the seedlings were removed from the tubes and the medium was separated from the roots, washing them with water for further analysis.

From a visual evaluation, it was observed that the best inoculation population was 10^6 CFU / mL , with the concentration of cells used in the subsequent experiments. The experiments were conducted with 20 seedlings for each treatment, and each bacterium

consisted of one treatment. The negative control consisted of uninoculated seedlings and positive control of seedlings inoculated with *A. brasiliensis*, totaling nine treatments.

2.4 Phytotechnical Characterization

After 30 days of inoculation, meristems were evaluated: fresh weight and shoot and root weight.

2.5 Host Colonization

The possible colonization of the bacteria inside the host plant was evaluated. Using all plant organs (roots, stems and leaves) that were cut, weighed and homogenized in sterile physiological solution. Subsequently, the homogenates were serially diluted and plated on NA medium. The identification of the isolates was performed by means of their protein profile by MALDI-TOF MS.

2.6 Contents of Photosynthetic Pigments

The chlorophyll content test was based on the methodology of Macedo et al. (2014). Leaf discs of 0.2 g were deposited in test tubes containing 10 mL of 80% acetone and then stored for 24 h at 5 ° C in the dark. After incubation, the absorbance was read in a spectrophotometer at wavelengths 645, 652, 663 and 470 nm. The content of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophylls and total carotenoids were calculated as follows: chlorophyll a = $[(12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}) V] / 1000W$; chlorophyll b = $[(22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663}) V] / 1000W$; total chlorophyll = $[A_{652} * 1000 * V / 1000W] / 34.5$; total carotenoids = $[(1000 * A_{470} - 3.27 * chl\ b) / 229] / (1000 * W)$. Where: A = absorbance at the indicated wavelength; V = final volume of the chlorophyll - acetone extract; W = fresh matter in grams of the plant material used. The results were expressed as milligram of pigment per gram of fresh leaf tissue weight ($mg\ g^{-1}$).

2.7 Foliate Anatomy

For the accomplishment of the foliar anatomy the treatment with better and the treatment with worse result for the phytotechnical tests were selected, besides the positive control and negative control. Three plants were randomly collected from each treatment and fixed in 70% ethanol. Transverse cuts were performed in the medial region of the leaf limb of the first fully expanded leaf. The samples were dehydrated in an increasing ethanolic series of 70%, 80%, 90% and 100%, for 2 hours in each concentration. Subsequently, the first stage of

infiltration of the samples with a 1: 1 solution (ethanol: methacrylate liquid resin) was performed for 24 h. The second stage of infiltration consisted in immersing the samples in activated resin for 72 hours at 10 ° C. After this period, the material was incorporated in solution of activated resin and hardener, until the material in an oven at 50 ° C solidified. The blocks containing the samples were aligned and fixed on wooden supports. The cross sections were made with 10 µm thickness in a rotating microtome. The samples were stained with 0.05% toluidine blue in acetate buffer at pH 4.7 for 3 min. After removal of the excess and drying of the dye, the slides were covered with acrylic enamel and cover slip.

The obtained sections were observed using a light optical microscope (Motic BA210) coupled to a digital camera (Moticam) for image capture. The generated photomicrographs were used for measurements of anatomical structures using Motic Images Plus 2.0 ML software. The measured characteristics were: thickness of the leaf blade (µm) and thickness of the epidermis (µm).

2.8 Scanning Electron Microscopy

The experiments were carried out at the Laboratory of Electron Microscopy and Ultra - Structural Analysis, Department of Phytopathology, Federal University of Lavras (UFPA), Lavras, Minas Gerais.

For Scanning Electron Microscopy (SEM) fresh fragments of the garlic bulb were collected from the nine treatments to observe the colonization of the plant by the isolates. Samples were cut by free hand, fixed in Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde, 2.0% paraformaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, 0.001 M CaCl₂, pH 7.2) and stored at 4 ° C for no minimum 24 hours. After fixation, the standard protocol for scanning electron microscopy described by Bozzola and Russel (1999) was used with some modifications. Samples were taken from the Karnovsky fixative and placed in glycerol for 30 minutes. Subsequently, cuts in liquid nitrogen (cryofatura) were followed by three washes in distilled water and acetone gradient dewatering (25%, 50%, 75%, 90% once and 100% for three times).

After dehydration, the samples were taken to the Balzers CPD 030 critical point apparatus to replace acetone with CO₂ and to complement the drying. The samples were mounted on carbon-coated aluminum foil holders on an aluminum foil film and covered with gold on the Balzers SCD 050 evaporator for observation in a scanning electron microscope LEO EVO 40 (ALVES, 2005).

2.9 Statistical Analyzes

The averages of the variables were: shoot length; fresh mass of the total part and the chlorophyll content in the leaves and the Scott-Knott statistical test with significance $p < 0.05$. The design was completely randomized and the results were subjected to analysis of variance.

3 RESULTS

The length of the garlic seedlings inoculated with growth promoting bacteria was higher in all treatments when compared to the negative control (Figures 1 and 2). Despite the variation between the treatments, inoculation with bacteria was positive for promotion of garlic growth in tissue culture. The seedlings inoculated with the M19B isolate had a longer length (150 mm), differentiating them from the positive control. Seedlings inoculated with the isolates M19B, CCMA 0056 and M9 were almost double the length compared to the treatment in which there was no inoculation.

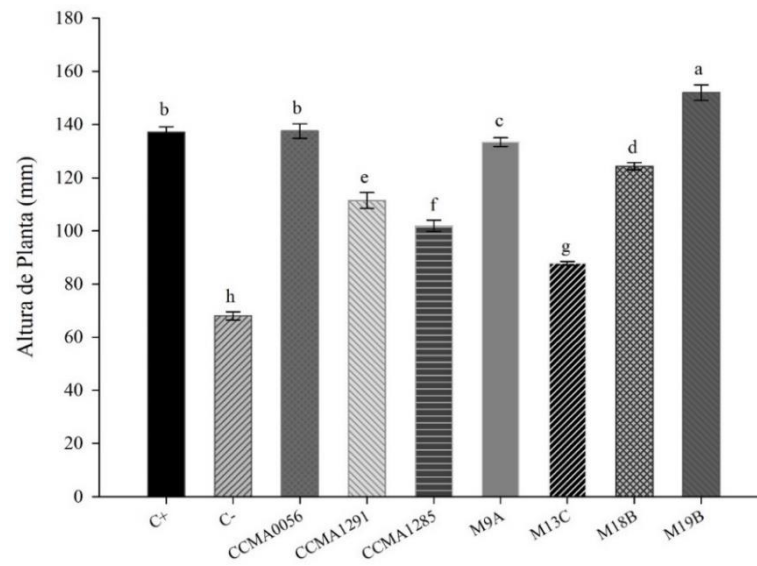
Figure 1 – Garlic seedlings after 30 days of inoculation with plant growth promoting bacteria.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: no inoculation.

1 cm

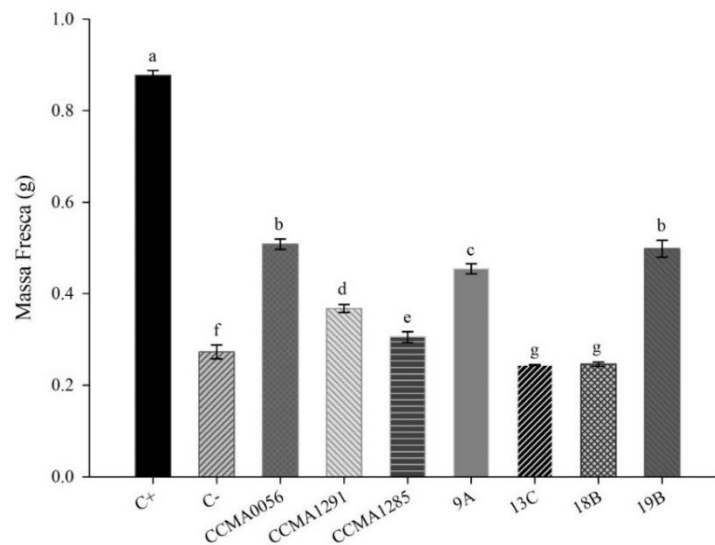
Figure 2 – Length (mm) of garlic seedlings inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: without inoculation. Equal letters do not differ from each other.

The bacterial inoculation had a positive effect on the fresh mass produced by the vegetable (Figure 3). The positive control showed the highest fresh mass values, followed by treatments with CCMA 0056 and M19B isolates. The treatments with the isolates M13C and M18B presented lower values of fresh mass, being below negative control.

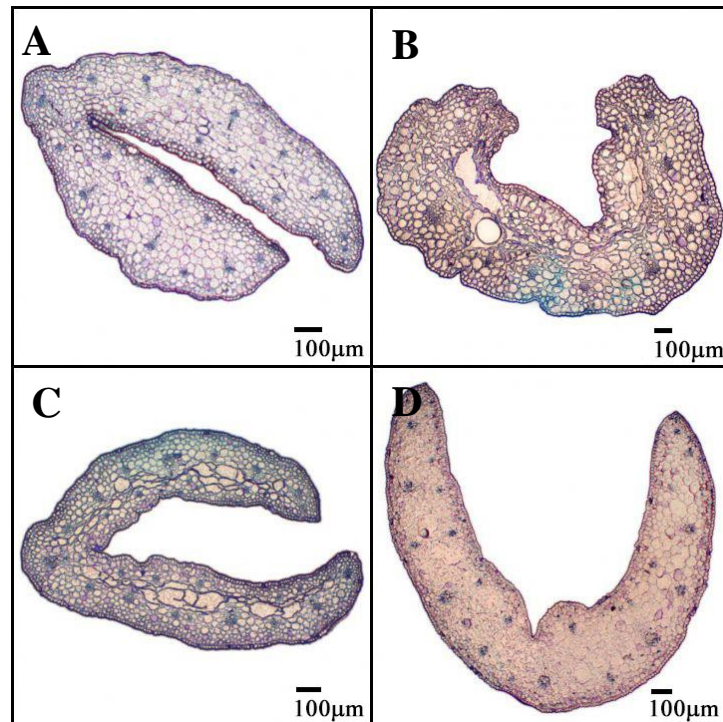
Figure 3 – Fresh (g) mass of garlic seedlings inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: without inoculation. Equal letters do not differ from each other.

The treatments selected for the anatomical sections were the plants inoculated with the isolates M13C and M19B, which had the worst and best result in the phytotechnical tests, respectively. The visual representation of the cuts is shown in figure 4.

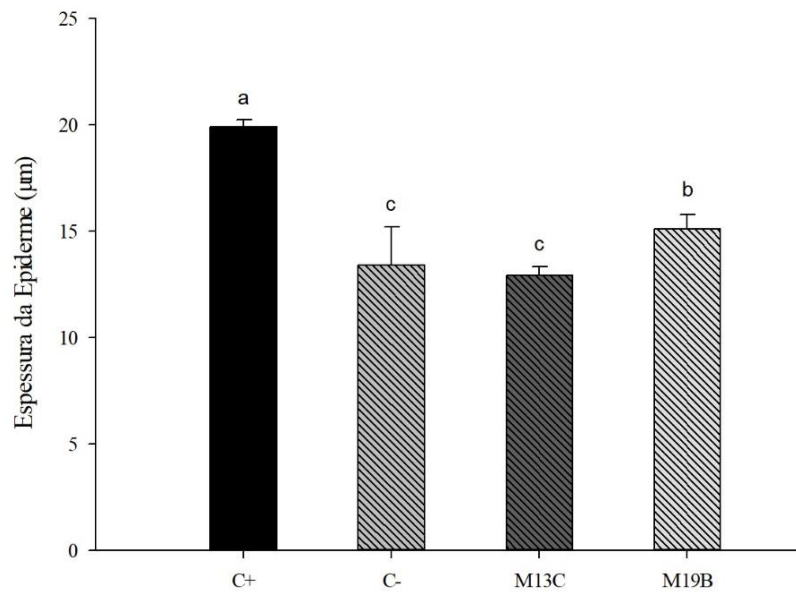
Figure 4 – Frontal views of transverse anatomical sections of garlic leaves inoculated with PGPB after 30 days of in vitro culture.



Legend: (A) Negative control, no bacteria; (B) Positive control - Ab-V5; (C) M13C - *Bacillus megaterium*; (D) M19B - *Enterobacter cloacae*.

The use of the M19B isolate provided greater thicknesses of the epidermis in relation to the negative control treatment and M13C (Figure 5).

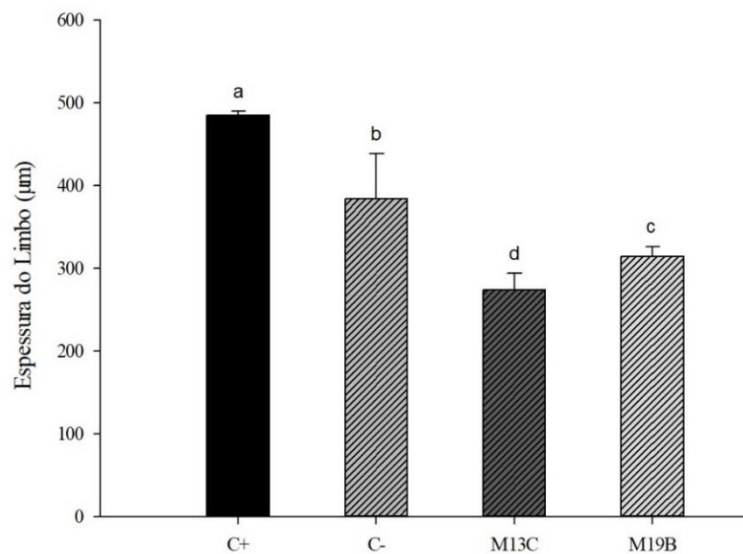
Figure 5 – Thickness of the epidermis of garlic leaves as a function of the inoculation of plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: without inoculation. Equal letters do not differ from each other.

There was a variance among all the treatments in the thickness of the leaf limb of garlic, demonstrating that the inoculation with PGPB was not efficient (Figure 6).

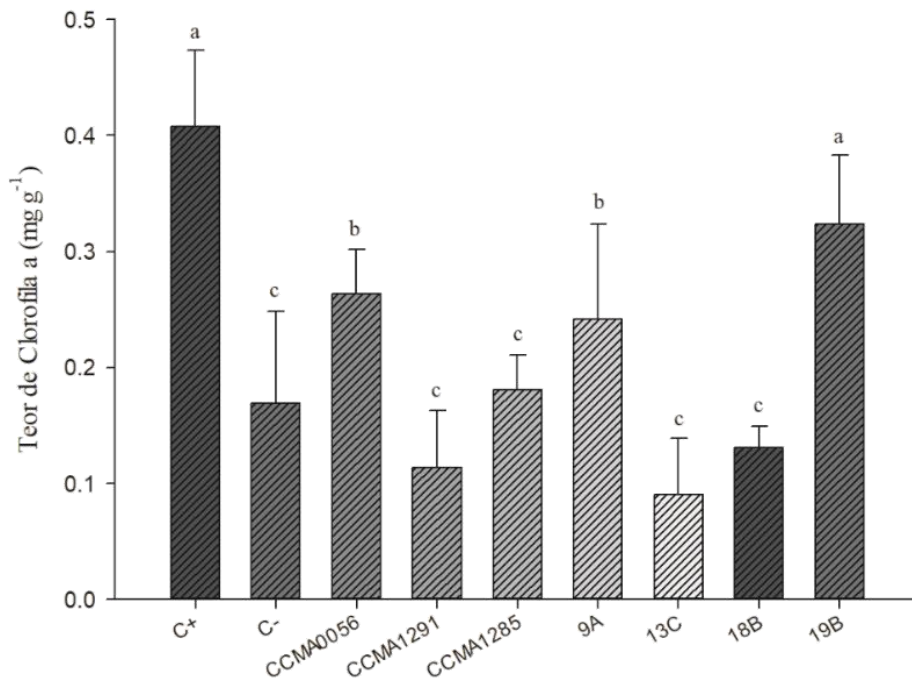
Figure 6 – Garlic leaf limb thickness (mm) as a function of inoculation of plant growth promoting bacteria after 30 days of culture in vitro.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: without inoculation. Equal letters do not differ from each other.

The levels of chlorophyll a and carotenoids were positively influenced by the inoculation of the garlic with the growth promoting bacteria (Figure 7 and 8). Chlorophyll a varied between treatments. The highest levels of chlorophyll a were observed in the treatments in which plants were inoculated with the isolate M19B and positive control, about 0.4 mg.g^{-1} . These results coincide with the visual appearance of the plants, and the positive control and the M19B treatment presented leaves with a darker green coloration. The treatments with inoculation of the isolates CCMA 1291, CCMA 1285, M13C and M18B did not differ from the negative control, demonstrating that inoculation of these microorganisms did not increase chlorophyll a production in garlic plants. There was no significant effect on chlorophyll b and total.

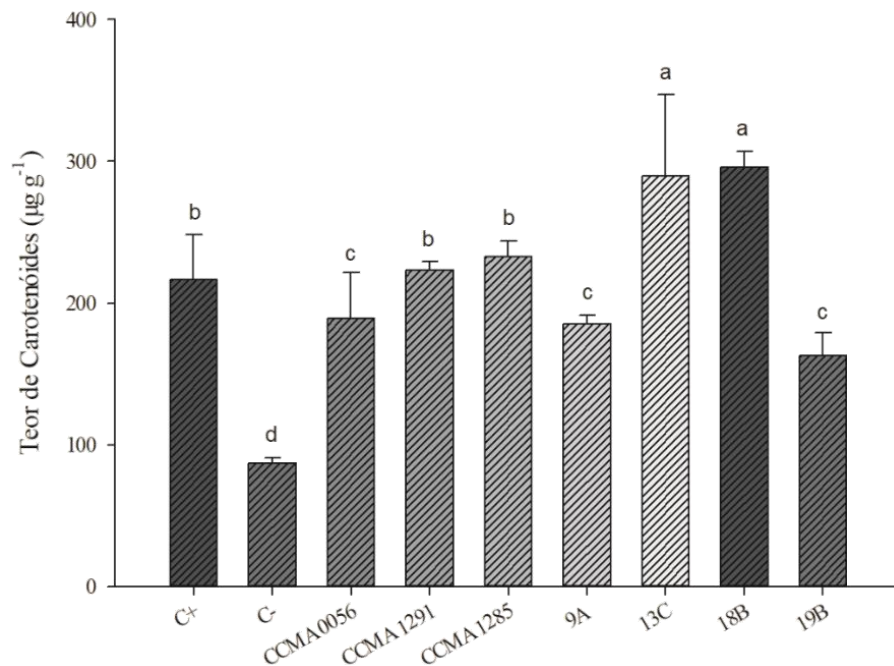
Figure 7 – Chlorophyll a content in garlic plant inoculated with different plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



Legend: C+: with inoculation (Ab-V5). C-: without inoculation. Equal letters do not differ from each other.

The mean values of carotenoids ranged from $90 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ to $300 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$. Inoculation with growth promoting bacteria increased carotenoid production in garlic seedlings. The carotenoids present in the treatments with the isolates M13C and M18B presented higher values than all the other treatments. Contrary to previous results, the treatments with the isolates M19B, CCMA 0056 and M9A presented the lowest levels of carotenoids.

Figure 8 - Carotenoid content in garlic plant inoculated with different plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



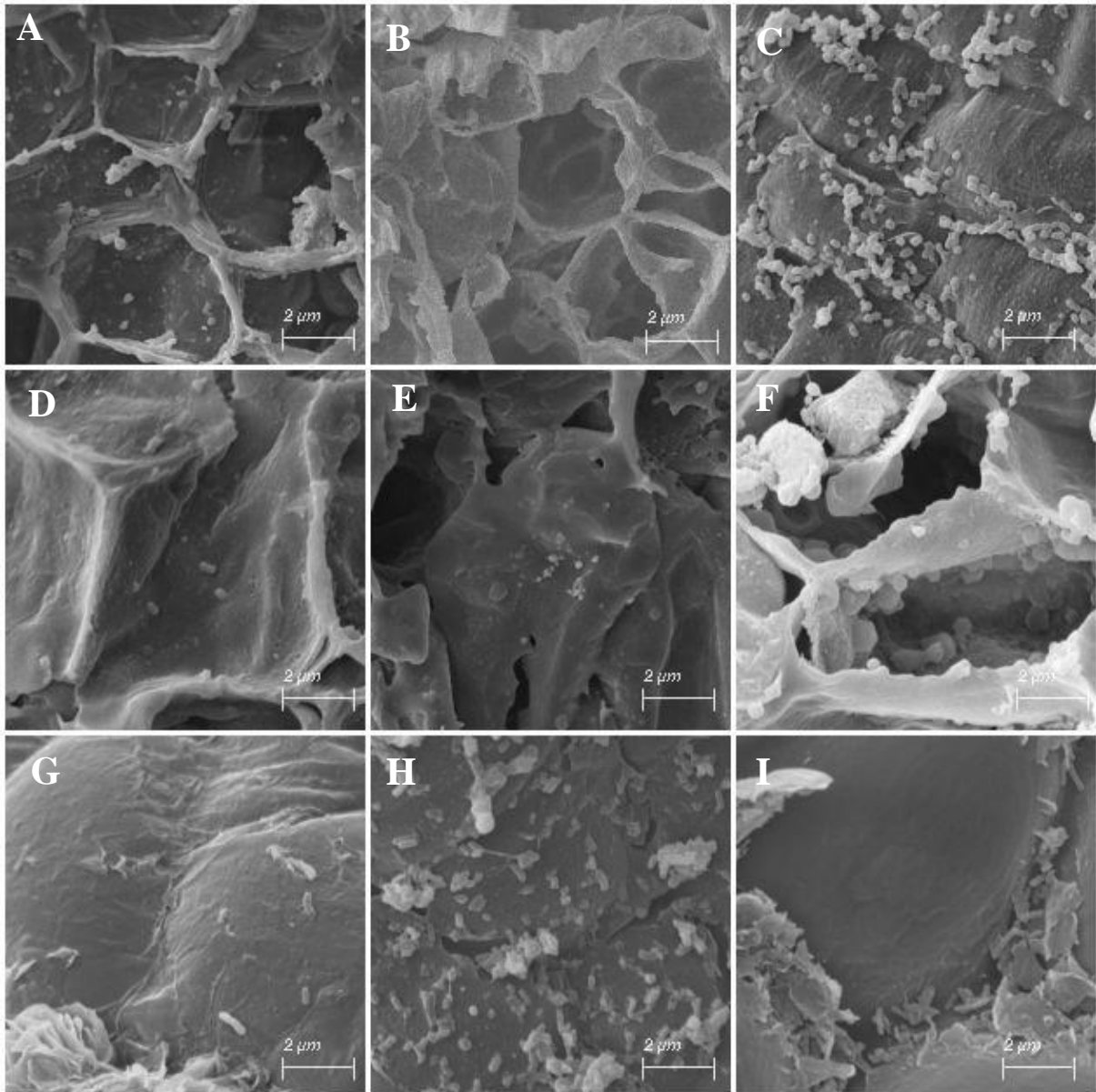
After identification by MALDI-TOF MS of the endophytic bacteria of the inoculated garlic, it was observed that the inoculation was efficient and all the bacteria remained viable after 30 days of inoculation, without the presence of contaminants (Table 2).

Table 2 – Identification by MALDI-TOF MS of the isolates inoculated into the plants after 30 days of in vitro culture.

Code	Identification MALDI-TOF MS	Score BM	Identification MALDI-TOF MS	Score Sec. BM
M9A	<i>Bacillus subtilis</i>	2.256	<i>Bacillus subtilis</i>	2.234
M13C	<i>Bacillus megaterium</i>	2.742	<i>Bacillus megaterium</i>	2.598
M18B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.587	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.465
M19B	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.705	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.553

All seedlings inoculated with growth promoting bacteria showed different degrees of colonization on both the surface and the inside of the plant tissue, with areas with low bacterial density and areas with bacterial aggregates (Figure 9). It is possible to verify the presence of bacterial cells on the surface of the inner wall of garlic, confirming that colonization occurred efficiently. It can be observed that the negative control (Figure 9B) did not present any type of microbial cell, evidencing that treatment in tissue culture was effective.

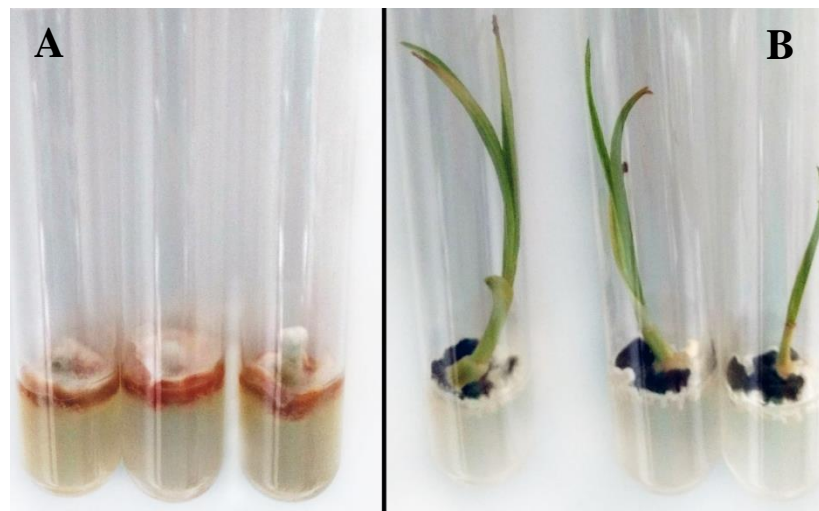
Figure 9 – Electronic micrograph of garlic bulbs inoculated with plant growth promoting bacteria after 30 days of in vitro culture.



Legend: (A) Positive control - Ab-V5; (B) Negative control, no bacteria; (C) CCMA 0056; (D) CCMA 1285; (E) CCMA 1291; (F) M9A; (G) M13C; (H) M18B; (I) M19B.

When trying to grow garlic in vitro with a part of the most developed plant tissue, fungal contamination was observed. The contaminants were identified by macro and microscopic characteristics such as *Sclerotium* sp. and *Penicillium* sp. The inoculation of *A. brasilense* allowed plant growth even with fungal contamination, whereas in the control treatment without inoculation of bacteria, the growth of the seedlings was totally inhibited (Figure 10).

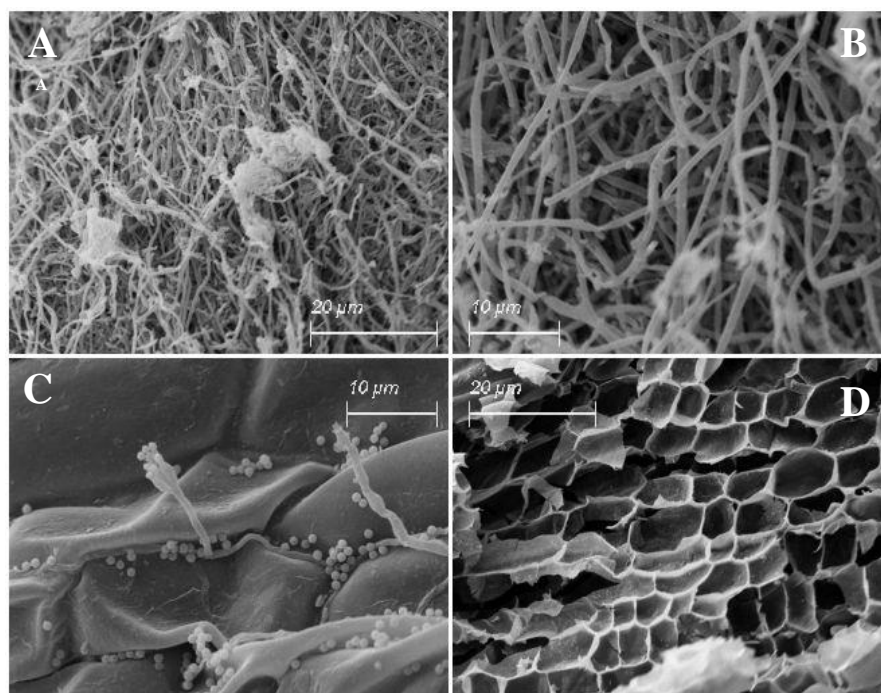
Figure 10 – Comparison of garlic plant development contaminated with filamentous fungi after 30 days of in vitro culture.



Legend: (A) Negative control; (B) Positive control - Ab-V5.

Electron micrographs allowed observation of colonization of fungal hyphae by bacteria (Figure 11). The hyphae of filamentous fungi were present in a large quantity and throughout plant tissue of plants without inoculation of bacteria, whereas positive control plants inoculated with *A. brasilense* did not present fungal hyphae or spores in the internal plant tissue, and few hyphae and spores on the outer wall of the plant.

Figure 11 – Electron micrograph of garlic plants contaminated with filamentous fungi after 30 days of in vitro culture.



Legend: (A) external wall, negative control; (B) internal wall, negative control; (C) external wall, positive control - Ab-V5; (C) internal wall, positive control - Ab-V5.

4 DISCUSSION

Inoculation with bacteria was efficient in promoting the growth of garlic in tissue culture. PGPB can favor plant development through direct and / or indirect mechanisms. PGPB facilitates the assimilation of nutrients (direct mechanism) available in the environment, such as nitrogen, iron and phosphorus, in order to increase plant biomass (GLICK, 2012).

Another direct mechanism for promoting plant growth is the modulation of phytohormone levels. The bacteria used in this work were able to produce high levels of the phytohormone auxin under in vitro conditions. Plant hormones play key roles in the growth and development of plants and the response of plants to the environment, favoring their resistance in the field (DAVIES, 2010). In addition, the phytoplankton and phytoplankton can produce phytohormones in in vitro conditions, so that many PGPBs can alter phytohormone levels and affect plant hormonal balance (SALAMONE et al., 2005; GLICK et al., 2007).

The isolates that provided the best results in promoting garlic growth by increasing plant length, fresh mass and chlorophyll content in this study were M19B (*E. cloacae*) and CCMA 0056 (*B. cepacia*). Similar results were found by Deepa et al. (2010) with the inoculation of cowpea seedlings with *E. cloacae*, in which they verified a positive effect on the inoculated plants, with a considerable influence on root and shoot length compared to uninoculated control, as well as a significant increase in biomass. In addition to the inoculation of the *B. cepacia* bacterium in maize, both the leaf area and root lengths and dry weights were significantly higher in relation to the control (ZHAO et al., 2014). These bacteria have a significant effect on plant growth of different cultures.

In the treatments in which the garlic seedlings obtained the greatest length were inoculated with bacteria that presented better results for auxin production in vitro. The increase of plant height can be explained by the hypothesis of acid growth, this theory proposes that auxin acidifies the region of the cell wall by stimulating the competent cell to excrete protons. The elongation of the cell wall would be due to the activation of enzymes that have acidic pH as the optimal pH, allowing water to enter and cell wall expansion (KERBAUY, 2004). Barka et al. (2000) by inoculating in vitro a grape variety (*Vitis vinifera*) with *Pseudomonas* sp. found that the plants had their growth significantly faster and with greater amount of secondary roots, roots and trichomes.

The cell wall has the function of conferring resistance to the mechanical actions of the wind and preventing the folding of the leaves. An increase in the thickness of the epidermal cell may confer greater leaf protection against the sun's rays, and maintain the temperature at optimal levels for the photosynthesis process (DICKISON, 2000). The increase in the thickness of the epidermis represents structural adaptation to minimize the effect of solar radiation, increase of physical resistance, guarantees greater control of the sweating and is an important parameter in the adaptation of a plant to the variation in light intensity (MARKESTEIJN et al., 2007; ROZENDAAL et al., 2006; SARIJEVA et al., 2007; JAVELLE et al., 2011). In this sense, PGPB inoculation, either by causing some type of stress or inducing some mechanism, may be modifying its cell wall. This confers resistance and, consequently, greater success in the acclimatization of plants in an external environment.

Isolates M13C and M19B were not able to increase leaf blade thickness. Despite this, Ab-V5 strain *Azospirillum brasilense* (positive control) was the treatment with the highest value for this variable, indicating that PGPB can increase the proportion of the tissue. According to Freschi et al. (2010), more developed chlorophyllous parenchyma may have more pigments, increasing the photosynthetic rates. The success in the production of seedlings is also related to the capacity to perform photosynthesis of the plant. This correlation was positive for the Positive Control.

Despite the variation in chlorophyll a values, there was a significant increase of these compounds in the treatments inoculated with the isolates CCMA 0056, M9A and M19B. The determination of the chlorophyll content in the leaves is an important indicator of the nitrogenous nutrition of the plants, since the main symptom associated with N deficiency is the yellowing of the leaves. The content of N in the leaf is high and positively correlated with the concentration of chlorophyll, and the concentration of the chlorophyll content is directly related to the photosynthetic capacity of the plants (DEON et al., 2013). Some authors use the Soil Plant Analysis Development (SPAD) index, which estimates the relative chlorophyll content, to evaluate the nutritional status in relation to the nitrogen supply (BLACKMER & SCHEPERS, 1994; WASKOM et al., 1996; MALAVOLTA, 2006). The highest value of chlorophyll a was for the plants inoculated with the isolate M19A, the same one that was highlighted due to its ability to fix atmospheric nitrogen in less than 48 hours in the in vitro test.

The carotenoid content is widely used as an indicator of abiotic and biotic tolerance in plants, acting as a strong antioxidant of reactive oxygen species (ASHRAF & HARRIS, 2013). Besides this function, the carotenoids of the green vegetable tissue, photosynthetically

active, are necessary for the photosynthetic function, being classified as primary carotenoids (LICHTENTHALER, 1987). The fact that a higher carotenoid content is observed in the treatment with the M13C isolate may be related to the stressful condition of the seedling cultivation, inducing a higher production of this compound. Or even the isolates that increased the production of carotenoids may be involved in the induction of plant resistance, in addition to plant growth.

The presence of the bacteria inside the garlic microbulbs demonstrated their competence in the colonization capacity during the transition from free to plant life. Fixation and colonization are modulated by PGPB abilities involved in important processes of soil survival, growth and function from the expression of several genes, such as those associated with exopolysaccharide biosynthesis (EPS) and biofilm formation (CORNFORTH & FOSTER, 2013; RUDRAPPA et al. 2008; MENESES et al., 2011; BEAUREGARD et al. 2013). One of the species used in this work and one of those that presented the best results is the *B. subtilis* bacterium, which is commonly used in plant growth promotion test for its potential. The *B. subtilis* bacterium is attracted by secreted L-malic acid, where bacterial biofilm formation is selectively triggered by L-malic acid in a process dependent on the same gene matrix required for in vitro biofilm formation (RUDRAPPA et al., 2008, BEAUREGARD et al., 2013), which allows its colonization and fixation in the vegetal cell wall. Cell-cell communication via quorum sensing (QS) regulates colonization of the microorganism and biocontrol (DANHORN & FUQUA, 2007). The quorum sensing involves intercellular signaling mechanisms that coordinate bacterial behavior, host colonization, and stress survival to monitor population density (DANHORN & FUQUA, 2007; SCHENK et al., 2012; HE & BAUER, 2014). Bacteria associated with plants often employ this signaling mechanism to modulate and coordinate interactions with plants (DANHORN E FUQUA, 2007).

The SEM result of the contaminated filamentous fungus samples indicated that the bacteria have mechanisms to promote indirect growth through systemic resistance induced (SRI). SRI is a process in which non-pathogenic microorganisms, including a number of PGPB, soften the deleterious effects of plant pathogens by activating a resistance mechanism in plants (VAN LOON et al. 1998). In addition to the biochemical biocontrol mechanisms in which a PGPB produces substances that are inhibitors of phytopathogens, it is possible that some PGPBs control phytopathogens through competition for nutrients or competition of physical space through the binding sites in the plant root. Such competition may act to limit

the binding of phytopathogen to the plant, hindering its proliferation (BARAHONA et al. 2011; INNEREBNER et al. 2011).

According to Elad & Chet (1987) it is generally believed that the competitiveness of PGPBs works in conjunction with other biocontrol mechanisms to prevent the functioning of phytopathogens. Another example was seen in the work of Porcel et al. (2014) showing the competitiveness of *Bacillus megaterium* in increasing the growth of tomato plants through competition for nutrients.

The bacteria were able to promote the growth of garlic seedlings by increasing wall thickening and biomass increase and, consequently, chlorophyll content.

5 CONCLUSION

Isolates M19B (*Enterobacter cloacae*) and CCMA 0056 (*Burkholderia cepacia*) are shown to be promising in promoting plant growth.

The PGPB inoculation technique proved to be efficient in tissue culture, allowing the effect of promoting the growth of the bacteria in the garlic seedlings.

REFERENCES

- AKTAR, W. et al. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.
- ALVES, E. Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. **Lavras: UFLA**, 2005.
- ASHRAF, M. H. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- BARAHONA, E. et al. A *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00320-11, 2011.
- BARKA, E. A. et al. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, n. 1, p. 91-95, 2000.
- BEAUREGARD, P. B. et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201218984, 2013.
- BLACKMER, T. M.; SCHEPERS, J. S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 25, n. 9-10, p. 1791-1800, 1994.
- BOKHTIAR, S. M.; SAKURAI, Katsutoshi. Effect of application of inorganic and organic fertilizers on growth, yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 7, n. 1, p. 33-37, 2005.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Jones & Bartlett Learning, 1999.
- BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201704.pdf> Acesso em 10 julho 2018.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 285, 2013.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 401-422, 2007.
- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: **Plant hormones**. Springer, Dordrecht, 2010. p. 1-15.
- DEEPA, C. K. et al. 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**, v. 26, n. 7, p. 1233-1240, 2010.
- DEON, M. D. et al. Efeito de doses de nitrogênio sobre os teores de clorofila e nitrogênio foliar na pereira, cv. Princesinha, cultivada no Vale do São Francisco. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO NORDESTINA DE

CIÊNCIA DO SOLO, 1., 2013, Areia. Soluções de desafios para o uso sustentável dos solos da região Nordeste. Areia: PPGCS: UFPB-CCA: SBCS, 2013.

DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. Academic Press, 2000.

ELAD, Y.; CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 190-195, 1987.

FRESCHI, L. et al. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 7, p. 526-533, 2010.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: **New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research**. Springer, Dordrecht, p. 329-339, 2007.

HE, K.; BAUER, C. E. Chemosensory signaling systems that control bacterial survival. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 7, p. 389-398, 2014.

INNEREBNER, G. et al. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3202-3210, 2011.

JAVELLE, M. et al. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. **New Phytologist**, v. 189, n. 1, p. 17-39, 2011.

KARTHIK, C. et al. *Cellulosimicrobium funkei*-like enhances the growth of *Phaseolus vulgaris* by modulating oxidative damage under Chromium (VI) toxicity. **Journal of advanced research**, v. 7, n. 6, p. 839-850, 2016.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHAN, A. L. et al. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2133-2144, 2013.

LICHTENTHALER H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, c. 34, p. 350-382, 1987.]

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

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.

MARKESTEIJN, L. et al. Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 4, p. 515-525, 2007.

MENESES, C. H. S. G. et al. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 12, p. 1448-1458, 2011.

MENEZES JÚNIOR, F. O. G. Cultivo in vitro do alho visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 158-167, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473-497, 1962.

- OLIVEIRA, A. L. M. 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.
- PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.
- PORCEL, Rosa et al. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 36, 2014.
- PURI, A. et al. Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-term trial. **Symbiosis**, v. 69, n. 2, p. 123-129, 2016.
- ROZENDAAL, D. M. A. et al. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. **Functional Ecology**, v. 20, n. 2, p. 207-216, 2006.
- RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant physiology**, v. 148, n. 3, p. 1547-1556, 2008.
- SALAMONE, I. E. G. et al. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Springer, Dordrecht, p. 173-195, 2005.
- SARIJEVA, G. et al. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of Ginkgo and Fagus. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 7, p. 950-955, 2007.
- SCHENK, Sebastian T. et al. Arabidopsis growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 2, p. 178-181, 2012.
- STATSOFT, I. **Statistica (data analysis software system)**, 2011. Disponível em: <www.statsoft.com>
- VAN LOON, L. C. et al. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.
- VIEIRA, R. L. et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 439-445, 2014.
- WASKOM, R. M. et al. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 27, n. 3-4, p. 545-560, 1996.
- ZHAO, K. et al. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 76-82, 2014.