

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIADAS A FRUTÍFERAS TROPICAIS**

POLLYANNA SANTIAGO LOPES RODRIGUES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2016**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIADAS A FRUTÍFERAS TROPICAIS**

POLLYANNA SANTIAGO LOPES RODRIGUES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

123/2016

Rodrigues, Pollyanna Santiago Lopes

Caracterização molecular e de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas associadas a frutíferas tropicais / Pollyanna Santiago Lopes Rodrigues. – Campos dos Goytacazes, 2016.

127 f. : il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Solos. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Fábio Lopes Olivares.

Área de concentração: Produção vegetal.

Bibliografia: f. 97-127.

1. FRUTÍFERAS 2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA 3. MOLECULAR 4. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO 5. BPCP I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Solos II. Título

CDD 634.6

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIADAS A FRUTÍFERAS TROPICAIS

POLLYANNA SANTIAGO LOPES RODRIGUES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 31 de março de 2016

Comissão Examinadora:

Luc Felicianus Marie Rouws (D.Sc., Química Biológica) - EMBRAPA

Prof^a Luciana Aparecida Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc.,Produção Vegetal) – UENF

Prof. Fabio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para essa vitória;

Ao meu marido, pelo companheirismo, compreensão, dedicação, paciência e amor incondicional;

Aos meus pais, meu eterno reconhecimento por terem me conduzido a esta conquista;

À minha avó Lia (*in memoriam*), pelo carinho e preocupação de sempre. Acredito que estará muito feliz por está vitória!

A FARPEJ, pela bolsa concedida;

Minha gratidão ao professor Fabio Lopes Olivares, pelos ensinamentos, oportunidade, orientação, paciência e competência;

À professora Aline Chaves Intorne, pelo auxílio e disposição;

Ao professor Alessandro Coutinho, pela colaboração de sempre;

Aos funcionários Arthur, Dona Helena, Janaína, por sempre estarem dispostos a nos ajudar;

Aos amigos do NUDIBA que me toleraram durante esses quatros anos, me ajudando com tudo que precisei e que foram “minha família” em Campos: Kamillinha, Aminthia, Lívia, Silézio, Taty e Jucimara;

Aos amigos incondicionais que estiveram sempre ao meu lado compartilhando todas as angústias, desesperos e alegria: Suzy, Nath, Leandro, Paty e Sumaya;

Não fosse compartilhar com todos vocês, esta jornada teria sido muito árdua.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cenário da Fruticultura no Brasil	3
2.2. Associação entre bactérias benéficas e plantas	5
2.3. A promoção do crescimento vegetal mediada por bactérias	7
2.4. Técnicas de identificação taxonômica de bactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas	11
2.5. Bactérias diazotróficas associadas às frutíferas	13
2.5.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	13
2.5.2. Gênero <i>Burkholderia</i>	14
2.5.3. Gênero <i>Herbaspirillum</i>	15
2.5.4. Gênero <i>Pseudomonas</i>	16
2.6. Potencial bioinoculante de bactérias promotoras de crescimento vegetal	16
3. TRABALHOS	20
MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED TO TROPICAL FRUITS CROPS	20
Abstract	20
1. Introduction	21

2. Material and Methods	23
3. Results.....	28
4. Discussion	33
5. Conclusions	38
Acknowledgements.....	38
References	39
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E A ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FRUTÍFERAS TROPICAIS.....	56
Resumo	56
Abstract	58
1. Introdução.....	59
2. Material e Métodos.....	64
3. Resultados.....	66
4. Discussão	73
5. Conclusões	79
Referências	90
4. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

RESUMO GERAL

RODRIGUES, Pollyanna Santiago Lopes; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2016. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A FRUTÍFERAS TROPICAIS; Orientador: Fabio Lopes Olivares.

O aumento da produtividade da fruticultura no Brasil tem demandado maior consumo de fertilizantes e pesticidas, com elevação dos custos de produção e danos ao ambiente. Diante disso, cresce na agricultura mundial a busca por tecnologias sustentáveis. Neste cenário, os micro-organismos têm merecido atenção, principalmente no que diz respeito ao estudo da diversidade e características relacionadas com a promoção do crescimento vegetal, visando à concepção de insumos biológicos na forma de inoculantes para produção de alimentos e energia. A literatura descreve inúmeras interações benéficas entre bactérias e plantas. Entretanto, pouco destaque tem dado ao uso dessas bactérias em frutíferas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de isolados bacterianos das frutíferas quanto às características moleculares, fenotípica e de promoção de crescimento de plantas. Para isso, foram realizados a caracterização molecular e fenotípica (ensaios bioquímicos e fisiológicos) de 32 isolados. Foi realizado também ensaios em casa de vegetação em que foi avaliado o efeito da inoculação em quatro ensaios independentes com 10, 8, 5 e 5 isolados bacterianos testados em plantas de abacaxi, mamão, goiaba e maracujá, respectivamente. Além disso, foi avaliada a capacidade de colonização de bactérias isoladas de maracujá e goiaba nas suas respectivas

plantas hospedeiras. O sequenciamento do 16S rDNA identificou quatro gêneros distintos: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Herbaspirillum*. A análise dos perfis de proteína (SDS-PAGE) e teste bioquímico (kit API 50CH) revelaram grande diversidade fenotípica e versatilidade metabólica entre os isolados de mesmo gênero. Todas as bactérias reduziram acetileno e também amplificaram o gene *nifH*, exceto um isolado. Em relação, à capacidade das bactérias em solubilizarem fósforo em meio sólido, 24 e 15 isolados o solubilizaram fosfato tricálcio e rocha fosfatada de araxá, respectivamente. Já, em meio líquido 29 isolados solubilizaram essa fonte de P. Dos isolados utilizados neste estudo, nove sintetizaram AIA e sete solubilizaram zinco. Em casa de vegetação, ensaio com plântulas micropropagadas de abacaxi cv. Smooth Cayenne evidenciou que as bactérias mais promissoras foram *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111, *Burkholderia* sp. UENF 111111 e *Azospirillum oryzae* UENF-114511. Para plântulas oriundas de sementes de goiaba cv. Paluma avaliadas *in vitro*, todos os isolados testados afetaram positivamente as taxas de germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento total. Em casa-de-vegetação, o isolado *Azospirillum* sp. UENF 211531 foi que se destacou apresentando maior incremento de biomassa dessa frutífera. Os resultados para mamão híbrido UCO1(Formosa) evidenciaram o potencial das estirpes *Azospirillum brasilense* UENF 312221, *Azospirillum* sp. UENF- 312223 e *A. formosense* UENF-311522. Em plantas de maracujá resultados mais consistentes foram obtidos para as estirpes *Azospirillum formosense* UENF 411202 e *Azospirillum brasilense* UENF 411211. Em plântulas de maracujá e goiaba foi evidenciada a colonização de *A. brasilense* e *Azospirillum* no eixo radicular. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que bactérias isoladas de frutíferas apresentam grande potencial para serem usadas como bioinoculante.

Palavras-chaves: Frutíferas, caracterização fenotípica, molecular, promoção de crescimento, BPCP.

ABSTRACT

RODRIGUES, Pollyanna Santiago Lopes; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2016. MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PLANT GROWTH PROMOTION OF BACTERIA DIAZOTROPHIC ASSOCIATED WITH TROPICAL FRUIT. Advisor: Fabio Lopes Olivares.

Increased fruit productivity in Brazil has demanded greater use of fertilizers and pesticides, with rising production costs and environmental damage. Thus, demanding in world agriculture search for sustainable technologies. In this scenario, the microorganisms have received attention, especially with regard to the study of diversity and characteristics related to the promotion of plant growth, in order to design biological inputs in the form of inoculants for production of food and energy. The literature describes several interactions between beneficial bacteria and plants. However, little attention is given to the use of these bacteria in fruit trees. Thus, the objective of this study was to evaluate the diversity of bacterial isolates from fruit trees as the molecular phenotypic characteristics and plant growth promotion potential. For this, it was performed a molecular and phenotypic characterization (tests biochemical and physiological) of 32 isolates. It was also carried out tests in a greenhouse in which we evaluated the effect of inoculation in four independent experiments with 10, 8, 5, 5 bacterial isolates tested in pineapple plants, papaya, guava and passion fruit, respectively. In addition, it evaluated the colonizing ability of bacteria isolated from passion fruit

and guava in their respective host plants. The sequencing of the 16S rDNA identified four distinct genera: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Herbaspirillum*. The analysis of protein profiles (SDS-PAGE) and biochemical testing (kit API 50CH) showed great phenotypic diversity and metabolic versatility among isolates of the same gen. All bacteria reduced acetylene and also amplified the *nifH* except one isolated. Regarding the ability of phosphorus solubilizing bacteria on solid medium, 24 and 15 isolates solubilized in the tricalcium phosphate source and phosphate Araxá-rock , respectively. Already, in a liquid medium 29 isolates solubilizing Araxá-P- rock. From the isolates used in this study, nine synthesized IAA seven solubilized zinc. In a greenhouse test with plantlets of pineapple cv. Smooth Cayenne showed that the most promising bacteria were *B. silvatlantica* UENF 117111, *Burkholderia* sp. UENF 111111 and *A. oryzae* UENF 114511. For plantlets from guava seeds cv. Paluma evaluated *in vitro*, all isolates tested positively affected the germination rates, germination speed index and length. Greenhouse, isolated *Azospirillum* sp. UENF 211531 was that stood out showing higher biomass increment of papaya tree. The results for hybrid papaya UCO1 (Formosa) showed the potential of strains *Azospirillum brasilense* UENF 312221, *Azospirillum* sp. UENF 311223 and *A.formosense* UENF 311522. In most consistent results were obtained passion fruit plants for strains *A. formonsense* UENF 411202 and *A. brasilense* UENF 411211. In passion fruit and guava seedlings were evidenced colonization of *A. brasilense* and *Azospirillum* sp and the root axis. The data obtained in this work show that bacteria isolated from fruit trees have great potential to be used as bioinoculants.

Keywords: Fruit trees, phenotypic characterization, molecular, growth promotion, BPCP.

1. INTRODUÇÃO

A fruticultura é uma atividade que se destaca no setor agrícola brasileiro por conta da grande variedade de espécies produzidas ao longo do ano, tendo em vista as condições climáticas favoráveis para o cultivo de frutas tropicais e subtropicais (Carvalho et al., 2008). Fatores climáticos associados à enorme quantidade de terras disponíveis contribuem para que o Brasil ocupe a terceira posição no ranking mundial de produção de frutas, com aproximadamente 41,6 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2013).

Em que pese a aptidão nacional para a fruticultura, seja pelas imensas áreas disponíveis, clima favorável, demanda crescente, dentre outros fatores, o uso inadequado, e por que não dizer exagerado, de fertilizantes agrícolas e técnicas que desprestigiam o meio ambiente impõe uma reflexão e desafio àqueles que se dedicam ao assunto. Tais práticas têm causado vários danos ao ambiente e ao homem, como eutrofização do solo, contaminação do lençol freático, aumento do efeito estufa, além de representar elevado custo financeiro (Carvalho e Zabot, 2012).

Para combater esses malefícios, métodos alternativos, de baixo custo e que garantam a sustentabilidade das práticas agrícolas têm despertado como nunca o interesse de estudiosos como forma necessária e urgente de conciliar alta produtividade e conservação ambiental. As interações benéficas dos micro-organismos presentes na microbiota do solo com as plantas estão no cerne dessa

questão, com destaque para as pesquisas sobre insumos biológicos, com o uso de micro-organismos aplicados ao crescimento vegetal.

Nesse sentido, a utilização de bactérias conhecidas como promotoras do crescimento vegetal –BPCP- (Bashan et al., 2008; Compant et al., 2010) como agentes do crescimento e proteção das plantas tem mostrado resultados satisfatórios. Esses efeitos favoráveis são causados por vários mecanismos de ação, como produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de compostos inorgânicos, controle biológico de fitopatógenos e tolerância a estresses abióticos (Ahemad e Kibret, 2014; Glick, 2012).

Diversos gêneros de bactérias promotoras do crescimento de plantas, como *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Bradirhizobium*, têm sido isolados de plantas de interesse agrícola, a exemplo do milho, cana-de açúcar, leguminosas e também de frutíferas de mamão, coco, banana, abacaxi (Mia et al., 2010; Santos, 2008; Tapia-Hernández et al., 2000).

Na literatura, inúmeros trabalhos relatam a promoção de crescimento proporcionado por essas bactérias em plantas como leguminosas e gramíneas (Beneduzi et al., 2013; Chung-Yang et al., 2014). Entretanto, poucos estudos têm dado ênfase aos benefícios dessas bactérias em frutíferas tropicais (Fernades et al., 2012, Baldotto et al., 2010).

Neste cenário, cresce a demanda por pesquisas que contemplem o isolamento e a caracterização fenotípica e molecular, consideradas importantes ferramentas para a identificação e seleção das principais características bacterianas relacionadas à promoção de crescimento vegetal. Desta forma, selecionar estirpes com potencial para a produção de bioinoculantes em frutíferas e buscar investigar como ocorre a interação bactéria-planta.

Diante disso o objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade de isolados bacterianos obtidos de frutíferas por meio de caracterização fenotípica e molecular e selecionar isolados com potencial quanto às características de promoção de crescimento *in vitro* e em casa de vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cenário da Fruticultura no Brasil

A fruticultura no Brasil é uma atividade de grande importância econômica e social, caracterizada por uma grande diversidade de espécies cultivadas distribuídas em um grande número de estados da federação, gerando mais de 5,6 milhões de empregos diretos (Reetz, 2014., Fachinello et al., 2011). O país possui posição de destaque neste ramo do agronegócio, sendo o terceiro produtor mundial de frutas, com aproximadamente 41,6 milhões de toneladas produzidas anualmente (IBGE, 2015). As frutíferas tropicais frescas, como laranja, maracujá, abacaxi, goiaba e mamão, estão presentes de forma significativa no mercado nacional e internacional (Lima et al., 2006).

O maracujá (*Passiflora edulis* Sims) é cultivado na maioria dos estados brasileiros, com uma área destinada à colheita de 57.183 hectares e com 823.284 toneladas de frutos produzidos (IBGE, 2015). Sua propagação se dá majoritariamente de forma sexuada por sementes, mas pode ser utilizada reprodução assexuada, pela utilização de estaquia, enxertia, alporquia e cultura de tecido *in vitro* (Ferreira et al., 2000; Meletti, 2000). A produção de maracujá tem sido destinada tanto para o consumo *in natura* como para a produção de suco, sendo esta última a principal forma de comercialização no mercado exterior (Aguiar e Santos, 2001). Os principais estados produtores são: Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2015).

O abacaxi (*Ananas comosus*) encontra no Brasil excelentes condições para o seu desenvolvimento e produção, sendo cultivado em quase todo território nacional. A produção nacional de 1.762.938 frutos/ano em 2014, obtida em 66.668 hectares, concentra-se em seis Estados: Pará, Paraíba, Minas Gerais, Bahia, Rio Grande do Norte e São Paulo (IBGE, 2015). As cultivares de abacaxi mais plantadas no Brasil são Perola e Smooth Cayenne, ambas suscetíveis a fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (Benfica et al., 2011). A propagação vegetativa é predominante nesta cultura, que se dá por meio de mudas tipo plântulas (a partir de gemas de seções do caule ou por cultura de tecidos), filhote, filhote rebentão, rebentão e coroa (Reinhart e Cunha, 2000; D' Eckenbrugge e Leal, 2003).

A goiaba (*Psidium guajava*) tem um amplo mercado, sendo consumida tanto interna quanto externamente. É cultivada em várias regiões, por desenvolver-se em quase todo tipo de clima e solo (Correa et al., 2004), ocupando uma área de 15.923 hectares e produzindo 359.349 toneladas de frutos (IBGE, 2015). É considerada uma das matérias-primas mais usadas na indústria brasileira de conserva, como, purê ou polpa, néctar, suco, compota, sorvete e doce (Gonzaga Neto e Soares, 2005). A sua propagação é tanto pelo uso de semente, como pelo método assexuado via enxertia e enraizamento adventício: estaquia e mergulhia (Dias et al., 2006). O método por semente foi o mais usado devido à maior facilidade de obtenção de mudas. Entretanto, esse método se constitui em obstáculo para a valorização comercial desta frutífera, em razão da alta heterogeneidade genética desta espécie. Diante disso, atualmente o uso de estaquia herbácea é a técnica mais usada (Zietmam e Roberto, 2007).

Outra frutífera em destaque é o mamoeiro (*Carica papaya*), que é uma das frutas mais cultivadas no país, ocupando uma área de 32.118 hectares e produção de 1.603.351 toneladas de frutos (IBGE, 2015), fato que contribui para que ocupe a segunda posição no *ranking* mundial de produção da fruta, com destaque para os estados da Bahia, Espírito Santo e Rio Grande Norte, considerados os maiores produtores (IBGE, 2015). Grande parte dos frutos é consumida *in natura*. As cultivares mais exploradas são Formosa e Solo (Serrano e Cattaneo, 2010). Essa cultura é propagada por sementes, estaquia e enxertia. Entretanto, o método utilizado principalmente em plantios comerciais é o de propagação por semente (Oliveira e Trindade, 2000).

A aptidão nacional para a produção de frutíferas tropicais e subtropicais resulta de grandes áreas disponíveis, amplitude de clima favorável, demanda crescente de mercado, dentre outros fatores. Este cenário favorável, na perspectiva do modelo atual de produção agrícola, resultará em demandas crescentes de fertilizantes e agrotóxicos. Estes insumos, importados de outros países e produzidos majoritariamente a partir de fontes não renováveis de energia, comprometem a soberania nacional, trazem insegurança econômica aos produtores face à flutuação de preços dos insumos, impactam o meio ambiente e contribuem para alterações climáticas, causando problemas ecológicos, econômicos e sociais (Grant, 2010).

O incremento da participação de insumos biológicos na produção de alimentos possui papel relevante nas pesquisas e tecnologias agropecuárias. À luz dos conhecimentos atuais, o uso de micro-organismos, seus processos e produtos representam uma alternativa viável para substituição parcial de fertilizantes minerais e agrotóxicos (Hungria et al., 2011). Nesta revisão, foram abordados os aspectos fundamentais e aplicados de uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como insumos promotores do crescimento de plantas de mamão, abacaxi, maracujá e goiaba.

2.2. Associação entre bactérias benéficas e plantas

A interação entre os micro-organismos e a planta no solo se dá ao longo da evolução das plantas em ecossistemas terrestres nos últimos 400 milhões de anos (Gaiero et al., 2013). Essa interação se inicia na rizosfera, região do solo em que é influenciada pelos exsudados radiculares (Trolldenier, 1989). A rizosfera é rica em nutrientes, principalmente em compostos orgânicos lábeis que são liberados pelas raízes e atraem diversas populações microbianas, estimulando, desta forma, o crescimento e a atividade dos micro-organismos, bem como alterando a estrutura das comunidades rizosféricas (Lemanceau et al., 1995; Grayston et al., 1998), fato que pode ser evidenciado pela grande quantidade de bactérias ali encontradas, cerca de 10 a 10.000 vezes mais do que as presentes nas demais regiões do solo. As interações dos micro-organismos e plantas são classificadas como nociva, benéfica e neutra (Leite e Araújo, 2007).

As interações benéficas planta-bactéria têm recebido muita atenção da pesquisa científica, bem como suas vertentes tecnológicas expressas no uso de

bactérias na forma de inoculantes microbianos, na agricultura (Bashan et al., 2014). Muitos desses micro-organismos são componentes de sistemas complexos que envolvem processos de ciclagem e disponibilização de nutrientes para as plantas, como o nitrogênio, através da fixação biológica (Hayat et al., 2010). As bactérias que contribuem nesse último processo são denominadas de diazotróficas, que apresentam várias interações com as plantas, dentre elas: simbióticas, associativas e de vida livre (Moreira et al., 2010).

A interação simbiótica é característica de leguminosas, com destaque para a produção da soja, por meio de bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, dentre outros, que formam estruturas diferenciadas nas raízes das plantas, os chamados nódulos (Oldroyd, 2013; Peoples et al., 1995). Já as bactérias diazotróficas que apresentam interação associativa são encontradas em plantas leguminosas e também em não leguminosas (Li et al., 2012; Florentino et al., 2012). Essas interagem com o sistema radicular das plantas e podem colonizar a superfície vegetal-rizoplano ou filoplano (Andrews e Harris, 2000) e também com o interior dos tecidos das plantas, as chamadas endofíticas (Azevedo, 1998).

Bactérias endofíticas apresentam grande vantagem em relação às epifíticas porque, ao sobreviverem no interior da planta, sofrem competição mais reduzida de nicho (Reinhold-Hurek e Hurek, 2011), tendendo a ter maior eficiência, por sofrerem menos influências dos fatores abióticos (Roesch et al., 2007; Hallmann et al., 1997). No entanto, é válido destacar que os micro-organismos podem transitar ou permanecer em mais de uma dessas interações durante o seu ciclo de vida (Hallmann et al., 1997).

As bactérias que compreendem o grupo das diazotróficas e das que estimulam o crescimento das plantas por outros mecanismos, como biocontrole, fazem parte do grupo das bactérias denominadas como “Plant Growth Promoting Bacteria” - PGPB (Compant et al., 2010). Elas exercem efeitos favoráveis sobre as plantas, destacando-se o aumento na taxa de germinação de sementes, no crescimento e no desenvolvimento, na produção de flores e no rendimento das culturas de interesse agrícola (Araújo et al., 2010; Amorim e Melo, 2002; Gopalakrishnan et al., 2012).

São exemplos de gêneros de bactérias que fazem parte dessa relação: *Azotobacter* sp. (Döbereiner, 1953), *Azospirillum* sp. (Pedraza et al., 2007),

Herbaspirillum spp., (Cruz et al., 2001), *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., (Fernandes et al., 2001) *Burkholderia* spp., (Cruz et al., 2001), dentre outras.

Estas PGPB têm sido isoladas de raízes, nódulos, caule e folhas (James et al., 1997) e encontradas em associação com diversas culturas de interesse agrícola, como cana-de-açúcar (Velázquez et al., 2008; Beneduzi et al., 2013), milho (Huang et al., 2010), algodão (Madhaiyan et al., 2010), arroz (Ashrafuzzaman et al., 2009), tomate (Amaresan et al., 2011), batata (Khan e Doty, 2009), trigo (Jhan e Kumar, 2009), morango (Pedraza et al., 2007), coqueiro, manga, laranja (Döbereiner, 1953), banana (Cruz et al., 2001; Mia et al., 2010), abacaxi (Cruz et al., 2001; Tapia-Hernandez et al., 2000; Santos, 2008) e maracujá (Munhoz e Lozano Tovar, 2007).

2.3. A promoção do crescimento vegetal mediada por bactérias

Na busca por alternativas mais sustentáveis ao modelo atual de produção de alimentos, tem crescido o interesse por bactérias promotoras do crescimento vegetal, as PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), como insumo para substituição, pelo menos parcial, dos fertilizantes minerais industrialmente processados (Compant et al., 2010; Glick, 2012). Este grupo de micro-organismos recebe tal denominação por atuar promovendo o crescimento das plantas, protegendo-as contra fitopatógenos e estresse abiótico (Souza et al., 2015; Ahemad e Kibret, 2014).

Os mecanismos de ação destas bactérias são: fixação biológica de nitrogênio (Islam et al., 2013), solubilização de fosfato e outros nutrientes inorgânicos (Sharma et al., 2013, Shahid et al., 2012), produção de análogos de fitormônios, como auxinas (Kochar e Srivastava, 2012), giberelinas (Kang et al., 2012) e citocininas (Hussain e Hasnain, 2011; Patel, 2001), a produção de sideróforos (Rungin et al., 2012) e indução de resistência sistêmica (Pérez-Montano et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o principal mecanismo de promoção de crescimento estudado, já que este nutriente é um dos mais importantes para o desenvolvimento das plantas. O processo consiste na conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), através das bactérias capazes de sintetizar o complexo enzimático da nitrogenase (Franche et al., 2009).

No Brasil, um exemplo clássico é o sucesso da soja devido aos programas de melhoramento voltados para a FBN, que resultaram no desenvolvimento de inoculantes com linhagens do gênero *Bradyrhizobium*, na redução e, principalmente, na recomendação de não aplicação de fertilizantes nitrogenados em milhões de hectares plantados com soja no Brasil (Döbereiner, 1989), com impactos decisivos na competitividade desta cultura na agenda de exportação e no PIB agrícola brasileiro.

Além dessas bactérias capazes de induzir nódulos em leguminosas, outras consideradas associativas ou de vida livre têm sido isoladas em gramíneas (Ji et al., 2014, Beneduzi et al., 2013). Em levantamento realizado por Reis e colaboradores (2000), quatro genótipos diferentes de cana-de-açúcar foram estudados, relatando a ocorrência de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasiliense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Nesta mesma cultura, espécies diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* foram relatadas colonizando tanto o interior das raízes como a parte aérea em interações tipicamente endofíticas (James e Olivares, 1998). Estas bactérias e também outros gêneros têm comprovado resposta positiva na inoculação em plantas dessa família (Figueiredo et al., 2009; Muangthong et al., 2015). A bactéria *Klebsiella variicola*, isolada da superfície de raízes desinfestadas de cana-de-açúcar, promoveu o crescimento desta planta em casa de vegetação (Chung-Yang et al., 2014).

Como o nitrogênio, o fósforo também é um dos nutrientes essenciais mais importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal. Isto se deve à reduzida concentração de fósforo livre (forma disponível para as plantas), já que a maior parte do fosfato inorgânico aplicado ao solo apresenta baixa mobilidade, devido à alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, o que o torna indisponível para as plantas (Richardson e Simpson, 2011; Kumar e Narula, 1999).

Diante disso, as bactérias solubilizadoras de fósforo atuam revertendo este processo, pois são capazes de solubilizar os complexos de fosfato, através de vários mecanismos, dentre eles, extrusão de prótons (H^+), produção de exopolissacarídeos (Yi et al., 2008), produção de sideróforos (Hamdali et al., 2008) e a produção de ácidos orgânicos (Panhwar et al., 2013). Este último é considerado o mais citado e estudado pelos pesquisadores. Nesse mecanismo, os ácidos orgânicos liberados diminuem o pH ou podem quelar os elementos que

acompanham os íons fosfato (Ca, Mg e Fe) (Marra et al., 2015) e assim tornar o fosfato disponível para as plantas.

A inoculação de estirpes de *Herbaspirillum* (H18 e ZA 15) e *Burkholderia vietnamiensis* (AR 114) em sementes de arroz contendo duas fontes de fertilizantes fosfatados (fosfato de cálcio e superfosfato simples) aumentou o rendimento de grão de 33% a 47% com o fosfato tricálcio e 18% a 44% com o superfosfato simples, respectivamente (Estrada et al., 2013).

Trabalho realizado por Yu et al. (2012) avaliou a interação entre bactérias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus megaterium*) e fixadoras de nitrogênio (*Arthrobacter pascens* e *Burkholderia cepacia*) em meio líquido na solubilização de rocha fosfatada. Esses autores verificaram uma correlação negativa entre o pH e a concentração de P solúvel, bem como a produção total de ácido orgânico e a solubilização de fósforo, sugerindo que a acidificação do meio pode facilitar a solubilização da rocha fosfatada.

Sob esta perspectiva, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (Sarkar et al., 2012; Panhwar et al., 2011; Walpola e Yoon, 2013; Marra et al., 2012). Alguns gêneros de bactérias são conhecidos como solubilizadores, dentre estes: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Azotobacter* (Rodriguez e Fraga, 1999; Kumar et al., 2001), *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium* (Wani et al., 2005).

Outro modo de ação das PGPB é a produção de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (Karadeniz et al., 2006). Estas substâncias são excretadas pelas bactérias em concentrações nano e micromolares, influenciando o desenvolvimento das plantas. Dentre estas, o ácido indol acético (AIA), hormônio do grupo das auxinas, é encontrado em maior quantidade nos vegetais (Ashrafuzzaman et al., 2009; Patten e Glick, 1996).

A promoção de crescimento da planta por meio deste hormônio deve-se principalmente a formação e aumento de raízes laterais, que geram ganho na absorção de água e nutrientes (Dimkpa et al., 2009). A capacidade de produção de AIA foi apresentada em trabalho realizado por Reetha et al. (2014) com as bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis* isoladas de cebola. As duas bactérias sintetizaram AIA, promovendo o aumento do comprimento das raízes e peso fresco e seco de parte aérea e das raízes de cebola. Bactérias

também do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* isoladas de cana-de-açúcar também sintetizaram AIA (Ashraf et al., 2011).

As PGPB não contribuem somente com o aspecto nutricional, elas também são benéficas ao agirem no controle de fitopatógenos, reduzindo o uso de defensivos químicos na agricultura. Os mecanismos de controle utilizados por essas bactérias podem ser por competição de nicho ecológico ou por substrato, produção de substâncias inibitórias ou por indução de resistência sistêmica contra patógenos (Glick, 1995).

Mecanismo que tem se destacado é o de produção de sideróforos, uma vez que está associado tanto à promoção de crescimento quanto ao controle biológico (Miethke e Marabel, 2007; Ahmad, 2008). Os sideróforos são substâncias de baixo peso molecular que, em condições de baixa disponibilidade de Fe^{+3} , são secretadas por micro-organismos para “sequestrar” Fe^{+3} , e assim estimular o crescimento das plantas por melhorar a nutrição e também por imobilizar para o crescimento de outros micro-organismos, incluindo os fitopatógenos (Miethke e Marabel, 2007; Vessey, 2003; Wang et al., 1993).

Diversos trabalhos têm comprovado a eficiência de bactérias em produzir sideróforos. Em estudo realizado por Solanki et al., (2014) verificou-se que bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MPF 47), isolada de rizosfera de tomate, teve efeito no controle de *Rhizoctonia solani*, quando inoculada no solo. Cepas de *Burkholderia cepacia* isoladas de rizosfera de manga inibiram o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* devido à produção de sideróforos (Villalobos et al., 2012).

Os pesquisadores têm dado atenção ao mecanismo de indução da tolerância sistêmica (ITS) promovida pelas PGPR em alterações químicas e físicas em plantas, que resultam no aumento da tolerância a estresses abióticos, como salinidade, déficit hídrico, altas temperaturas, dentre outros (Yang et al., 2009, Milošević et al., 2012).

Uma das mais importantes adaptações presentes em muitas bactérias, que protegem as plantas de condições adversas e estimulam seu crescimento, é a produção da enzima ACC- deaminase (Milošević et al., 2012, Glick, 2014). Ela é responsável por regular a produção de etileno nas raízes das plantas (precursor da síntese de etileno em plantas) (Glick et al., 1998). Bactérias com propriedade ACC reduzem a produção de etileno em condições de estresse (Glick, 2014).

Na literatura, existem alguns trabalhos que comprovam o efeito satisfatório da produção de enzima ACC deaminase por PGPR sobre a concentração de etileno. Trabalho realizado por Bal et al. (2013) comprovou que a inoculação de bactérias produtoras de ACC deaminase, isoladas de rizosfera de arroz, reduziu a produção de etileno sob condições de estresse salino. Bactéria *Enterobacter cloacae* isolada de raízes de planta herbácea produziu ACC-deaminase e amônia e fixou nitrogênio. Além disso, essa bactéria apresentou tolerância às concentrações de até 6% de NaCl e capacidade de crescimento de pH 11 e temperatura 50°C (Singh e Jha, 2015).

2.4. Técnicas de identificação taxonômica de bactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas

A cada dia cresce a demanda por estudos que buscam investigar a diversidade de micro-organismos no solo, tendo em vista as funções cruciais que desempenham na manutenção dos ecossistemas e nos ciclos biogeoquímicos (Siqueira et al., 1994). Sendo assim, o conhecimento sobre a diversidade microbiana, com destaque para as bactérias, facilita a compreensão das funções exercidas no ambiente terrestre e das suas interações com as plantas (Colwell, 2000). Para tal fim, é necessário realizar a caracterização das bactérias, que é importante para sua identificação e para a descoberta de micro-organismos exploráveis para o potencial biotecnológico.

As técnicas de identificação de micro-organismos mais empregadas foram baseadas nos métodos fenotípicos. Essa caracterização compreende os resultados obtidos da caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica, que são empregados nos laboratórios de microbiologia, (Figueiredo et al., 2011) principalmente por apresentarem baixo custo.

No que se refere à caracterização bioquímica, uma das técnicas usadas é a de proteínas totais por eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que tem sido empregada para identificação e agrupamento de bactérias promotoras do crescimento vegetal, por ser uma técnica eficaz para estudar as relações taxonômicas de grupos muito próximos (Nóbrega et al., 2004, Lima et al., 2005). Este método foi utilizado por Figueiredo et al. (2009) na caracterização de bactérias *Bacillus* isoladas de raízes de leguminosa. O estudo da diversidade de

Bradyrhizobium spp., isolados de diferentes solos da Amazônia, também utilizou esse método (Lima et al., 2005).

A habilidade das bactérias utilizarem diferentes fontes de carbono pode ser usada para agrupamento, diferenciação de suas espécies e de sua versatilidade metabólica. Essa é outra técnica bioquímica para identificação que pode ser realizada através de kits comerciais API (bioMérieux) ou Biolog. É considerada uma técnica muito fácil e rápida de ser usada (Busse et al., 1996). A identificação de bactéria *Enterobacter cloacae*, isolada de raízes de alfafa, foi obtida com o uso do kit API, resultado este que foi confirmado quando do sequenciamento do 16S rDNA, mostrando que essa técnica pode fornecer identificação precisa (Khalifa et al., 2016).

No entanto, os métodos fenotípicos não são apenas usados para identificação de bactérias, servindo também para caracterizá-las quanto às suas atividades funcionais por meio dos testes fisiológicos, tais como: solubilização de fósforo, produção de AIA e sideróforos e fixação biológica de nitrogênio (Park et al., 2005). Dessa forma, essa caracterização permite selecionar isolados com características de interesse para serem usados em futuras aplicações biotecnológicas.

No que diz respeito à taxonomia, por sua vez, os testes fenotípicos, apesar de serem considerados a base consagrada para classificação de micro-organismos, não são suficientes para fazer as inferências taxonômicas (Figueiredo et al., 2011). No entanto, a caracterização genotípica é mais confiável e informativa (Woese, 1987). Nesse cenário, o estudo da taxonomia das bactérias baseia-se na combinação de ambos os métodos dentro de uma abordagem polifásica.

Objetivando metodologias que proporcionassem a identificação mais rápida e precisa de micro-organismos (Straliotto, 1999), técnicas de PCR (Innis et al., 1988) e de sequenciamento direto do DNA amplificado (Figueiredo et al., 2010) representaram uma revolução na taxonomia e filogenia de procariotos. O RNA ribossomal é considerado o mais usado, por estar presente em todos os organismos, em diferentes posições na sequência, fato que permite fazer inferências filogenéticas entre eles (Woese, 1987).

Entretanto, para a identificação bacteriana, o sequenciamento do 16S rDNA é o método mais usado (Clarridge, 2004). Presente em todas as bactérias,

é uma região conservada, que não sofre influência por alterações no meio ambiente e apresenta tamanho suficiente (1500pb) para fornecer informações relevantes da sequência (Patel, 2001). Além do mais, apresenta uma ampla base de dados para comparação das sequências do rDNA. Tal técnica permitiu, exemplificativamente, a identificação de cinco gêneros de bactérias, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Ensifer* e *Leclercia*, provenientes de rizosfera e raízes de plantas leguminosas e não leguminosas em solos do Pasquistão (Naveed et al., 2014).

2.5. Bactérias diazotróficas associadas às frutíferas

2.5.1 Gênero *Azospirillum*

Esse gênero foi inicialmente descrito por Beijerinck em 1925 como *Spirillum lipoferum* e, em 1978, foi reclassificado como *Azospirillum* (Tarrand et al., 1978). Atualmente são descritas 16 espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largomobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. formosense* e *A. B510* (Rosenberg et al., 2014). Entretanto, *A. brasilense* e *lipoferum* são as mais estudadas, pela ampla ocorrência geográfica (Döbereiner et al., 1976).

Bactérias desse gênero são gram-negativas de vida livre e fazem parte da classe das α -Proteobactérias. As suas células apresentam formato vibrio e/ou espirilo e frequentemente com único flagelo polar e vários flagelos laterais de comprimento menor e alta motilidade (Rosenberg et al., 2014). Estas são preferencialmente microaerófilas, mas também podem crescer em ambientes aeróbicos (Moreira et al., 2010). Elas são encontradas em associação com várias espécies de plantas, dentre elas: cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo e diversas forrageiras e também em frutíferas (Tortora et al., 2012; Ilyas et al., 2012; Hungria et al., 2010; Weber et al., 1999), podendo colonizar a rizosfera, raízes e/ou o interior das plantas (Bashan e Levanony, 1990), o que as classificam como endofíticas facultativas (Sumner, 1990, Hartmann e Baldani, 2006).

As fontes de carbono mais usadas por esse gênero são: malato, piruvato e succinato, frutose e glicose (Hartmann e Baldani, 2006), apresentando grande versatilidade, fato que contribui com sua adaptação em ambiente competitivo na rizosfera. Bactérias desse gênero são consideradas as mais estudadas, devido à capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, produzir fitormônios e controlar

os fitopatógenos (Bashan et al., 2004; Tortora et al., 2012) e desta forma, melhorar o rendimento de diferentes espécies de plantas de importância agrônômica (Bashan et al., 2004)

Além disso, esses micro-organismos podem apresentar alguns mecanismos fisiológicos de proteção, como: poli- β -hidroxibutirato e formação de cistos em condições de estresse, como dessecação e limitação de nutriente e assim favorecer a sobrevivência em ambientes desfavoráveis (Bashan, 1991; Bashan e Levanony, 1990).

2.5.2. Gênero *Burkholderia*

Bactérias desse gênero são gram-negativas que pertencem à classe β -Proteobacteria e apresentam bastonetes retos, móveis com um ou mais flagelos (Gillis et al., 1995). São descritas mais de 100 espécies, que são formadas por micro-organismos que causam doenças ao homem, ao animal e às plantas, e também por bactérias promotoras do crescimento vegetal e degradadoras de poluentes (Moreira et al., 2010; Woods e Sokol, 2006). Esses micro-organismos são encontrados em diversos nichos ecológicos: solo, água, rizosfera, animal e humano (Stoyanova et al., 2007).

B. cepacia foi a primeira bactéria desse gênero a ser descrita (Burkholder, 1950) e foi classificada como agente causal da podridão mole em cebola e é considerada um patógeno de infecções hospitalares principalmente de pacientes com fibrose cística (Woods e Sokol, 2006; Coenye e Vandamme, 2003).

Entretanto, esse gênero é formado também por bactérias que apresentam interações benéficas com as plantas e podem colonizá-las, endofítica ou endossimbioticamente (Coenye e Vandamme, 2003, Suarez-Moreno et al., 2012). Muitos desses micro-organismos podem fixar nitrogênio atmosférico (Moreira et al., 2010). Estudos mostraram capacidade de algumas espécies em nodular leguminosas (Chen et al., 2008; Chen et al., 2007; Vandamme et al., 2002). Além disso, apresentam atividade antimicrobiana, produzem fitormônios e solubilizam fósforo (Paungfoo-Lonhienne et al., 2014; Cuong et al., 2011; Estrada et al., 2012).

Algumas espécies *B. vietnamiensis*, *B. tropica*, *B.unamae*, e *B. silvatlântica*, as mais estudadas, são consideradas como promotoras do crescimento vegetal (Perin et al., 2006; Bernabeu et al., 2015, Baldotto et al.,

2010). Essas foram isoladas de cana-de-açúcar, milho, arroz, tomate, gramíneas, frutíferas, dentre outras (Perin et al., 2006; Reis et al., 2004; Weber et al., 2000).

2.5.3. Gênero *Herbaspirillum*

Esse gênero pertence à classe das β -Proteobacteria, sendo gram-negativas, geralmente com formato de células vibrioides, e muito móveis com a presença de um ou mais flagelos (Schmid et al., 2006). Espécies desse gênero são classificadas como endofíticas obrigatórias (Schmid et al., 2006), apresentando baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1992). Trabalhos mostraram que já foram isoladas do interior de raízes, folhas e caules de gramíneas, sorgo, milho, arroz, cana-de-açúcar e também de frutíferas de abacaxi e banana (Olivares et al., 1996; Weber et al., 2001; Baldani et al., 1996; Cruz et al., 2001). Espécies desse gênero podem metabolizar ácidos orgânicos como malato, succinato, piruvato e citrato (Baldani et al., 1986).

Várias espécies fazem parte desse gênero, dentre elas: *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. chlorophenolicum*, *H. huttiense subsp. huttiense*, *H. hiltneri*, *H. rhizosphaerae*, *H. huttiense subsp. putei*, *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* *H. seropedicae* (Rothballer et al., 2006; Valverde et al., 2003; Kirchhof et al., 2001; Baldani et al., 1996; Im et al., 2004; Dobritsa et al., 2010). Entretanto, algumas espécies como *H. rubrisulbalbicans*, *H. lusitanum*, *H. frisingense* e *H. seropedicae* fixam nitrogênio e são microaeróbicas (Schmid et al., 2006).

A espécie *H. seropedicae* foi inicialmente isolada de milho, sorgo e arroz e descrita por Baldani em 1986 (Baldani et al., 1986). Atualmente, essa tem despertado o interesse de pesquisadores por apresentar potencial para ser usada como bioinoculante, visto que, além de fixar nitrogênio, essa espécie também produz hormônios, auxina, giberelina (Bastián et al., 1998; Yin et al., 2015). Apresenta, ainda, uma grande vantagem quando comparada com outros gêneros por não ter que competir com outros micro-organismos presentes no solo (Moreira et al., 2010). Estudos realizados com essa espécie em plantas comprovaram que elas promovem o crescimento de várias plantas (Neiverth et al., 2014; Santos et al., 2015; Araújo et al., 2014).

2.5.4. Gênero *Pseudomonas*

Esse gênero é formado por bactérias aeróbicas, gram-negativas que fazem parte da classe das gamma-proteobactéria, e apresentam bastonetes retos ou curvos, móveis e com um ou mais flagelos polares (Stanier et al., 1966). Apresentam uma grande diversidade de bactérias, dentre elas, as que causam doenças ao homem, aos animais, às plantas e as que promovem o crescimento de plantas (Bodey et al., 1983; Preston, 2004).

Dentre esse grupo, as bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* são consideradas as mais estudadas. Estas produzem pigmentos verde-amarelo fluorescente em meio King B (King et al., 1954) e podem ser encontradas na água e no solo (Stanier et al., 1966). São capazes de solubilizar fósforo, produzir AIA e controlar patógenos (Gupta et al., 2005). A vantagem desse gênero é a versatilidade metabólica que faz com que apresente habilidade para sobreviver em qualquer ambiente (Buchanan e Gibbons, 1974).

Pseudomonas monteilii também é outra espécie que vem sendo testada pelos pesquisadores, na promoção de crescimento das plantas e também na degradação de poluentes ambientais (Vojtková et al., 2014; Rani et al., 2009; Dharni et al., 2014). Esta foi originalmente isolada de espécime clínicos (Elomari et al., 1997), mas há relatos de isolamentos no solo e também de lagos e esgoto (Masuda et al., 2007; Dharni et al., 2014). Esses micro-organismos são capazes de solubilizar fósforo, produzir AIA e sideróforos, sendo considerados tolerantes a metais pesados (Dharni et al., 2014; Rani et al., 2009), mostrando um grande potencial biotecnológico.

2.6. Potencial bioinoculante de bactérias promotoras de crescimento vegetal

O inoculante bacteriano é um produto que contém micro-organismos com ação benéfica para o desenvolvimento das plantas. Segundo Bashan (1998), os inoculantes bacterianos são formulações que contêm uma ou mais estirpes bacterianas com a capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal por mecanismos baseados em efeitos biofertilizantes, bioestimulantes e de biocontrole de agentes fitopatogênicos.

Para se viabilizar sua produção e o lançamento comercial de bioinoculantes, entretanto, segundo Araújo (1997), é necessário percorrer várias etapas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Inicialmente, deve-se realizar

a seleção de bactérias em laboratório, utilizando-se de um número grande de isolados, para, em seguida, realizar seleção de isolados promissores quanto a características de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação. Os melhores isolados são avaliados em condições de campos e isolados “elite” em formulações comerciais são testados em diferentes condições edafoclimáticas em pelo menos dois anos agrícolas.

Com vistas à obtenção de um resultado confiável, estes testes devem ser feitos em rede, em várias instituições, em diversos locais do Brasil, de forma a comparar o resultado com as estirpes padrão. Após todo este processo, as melhores estirpes são submetidas e, posteriormente, recomendadas pelo Ministério da Agricultura para serem distribuídas para empresas produtoras de bioinoculantes. É importante ressaltar que todas as etapas de produção de bioinoculante contendo micro-organismos benéficos à planta devem ser feitas de acordo com protocolos estabelecidos pela rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão da tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE) (Araújo, 1997).

O mercado oferece hoje para os produtores formulações em líquido, gel e sólido (Bashan et al., 2014). Dentre eles, o veículo mais utilizado é o sólido (turfa), por conta de suas propriedades de alta capacidade de retenção de água e por favorecer o desenvolvimento, a sobrevivência e a viabilidade das células das bactérias (Smith, 1992). Contudo, algumas pesquisas vêm testando outros veículos para bioinoculantes. Estudos realizados pelo Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA), por exemplo, utilizam a combinação de ácidos húmicos com bactérias endofíticas (Canellas et al., 2002; Canellas et al., 2012). Tal combinação tem apresentado resultados satisfatórios, pois o ácido húmico favorece o crescimento radicular através do aumento do número de sítios de mitose e emergência de raízes laterais, contribuindo com maior número de pontos de infecção para as bactérias (Canellas et al., 2002; Conceição et al., 2009).

No mercado brasileiro, em que pese a utilização de bioinoculantes ser preponderantemente para leguminosas. A título de registro, o primeiro inoculante no Brasil produzido foi destinado à cultura da soja (Freire e Vernetti, 1997; Reis Junior et al., 2011). Apesar disso, o uso de inoculantes para plantas não-leguminosas já é autorizado, destacando-se os que contêm fixadores de

nitrogênio para as culturas de milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar (Hungria et al., 2011; Reis et al., 2009). Em julho de 2009, foi lançado o primeiro inoculante para a cultura do milho, o Masterfix Gramíneas TM, com um potencial para economia de até 50% na utilização de fertilizantes nitrogenados industriais (Hungria et al., 2010). O produto foi desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Soja e a Universidade Federal do Paraná (UFPR), que conduziram trabalho de validação de estirpes de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho e trigo, em parceria com a iniciativa privada.

Nos últimos anos percebe-se que tem aumentado o interesse nas bactérias promotoras do crescimento de plantas, principalmente, na possibilidade de seu uso como bioinoculante (Reis Junior e Reis, 2009; Mariano et al., 2004). Tal interesse tem razão de ser, uma vez que já foi demonstrado que estas bactérias aceleram a emergência das plântulas, promovem o controle de fitopatógenos (Bouizgarne, 2013; Herman et al., 2008; Kloepper et al., 1990) e auxiliam no crescimento do vegetal (Sarahan e Nebra, 2011; Bent e Chanway, 1998). Entretanto, apesar de vários estudos terem comprovando a eficiência das PGPB em leguminosas e gramíneas, poucos foram empreendidos no que se relaciona à resposta de inoculação de bactérias em frutíferas tropicais (Weber et al., 1999; Webber et al., 2003), sobretudo na produção de mudas (Fernandes et al., 2013).

Estes resultados apontam para um cenário igualmente promissor para o desenvolvimento de inoculantes para frutíferas, já que bactérias isoladas de frutíferas têm apresentado resultados satisfatórios (Filho et al., 2012; Baldotto et al., 2010). George et al. (2013), por exemplo, constataram que as bactérias *Serratia marcescens* e *Enterobacter* sp., isoladas de coqueiro, foram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato *in vitro*. Em casa de vegetação, estas bactérias proporcionaram aumento de crescimento de mudas de coqueiro e absorção de nutrientes.

Bactérias isoladas de ápices caulinares de bananeira das cultivares Tropical e Galil 18 promoveram o aumento do comprimento e diâmetro do pseudocaule e o número de folhas de mudas micropropagadas de bananeira Prata-Anã (Fernandes et al., 2012). Mudanças micropropagadas de abacaxi Champaka inoculadas *Asia bogorensis* - 219 apresentaram maior crescimento

inicial de folhas e de peso de frutos, quando comparadas às mudas não inoculadas (Weber et al., 2009).

Além de todas as vantagens econômicas, o uso das PGPB como bioinoculantes tem uma importância ambiental, pois contribui para o aumento da produtividade de maneira sustentável. Tal utilização evita a degradação de solos, causada pelo uso indiscriminado de fertilizantes e defensivos agrícolas, permitindo também a produção de alimentos de maior qualidade e reduzindo os custos para o produtor. Evita ainda a eutrofização dos ambientes aquáticos, por reduzir a quantidade de nutrientes lixiviados, e também contribui reduzindo a emissão de gases necessários para a produção de adubos nitrogenados, cujo consumo de energia é bastante dispendioso (Smith et al., 1997; IFA, 2000).

3. TRABALHOS

MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED TO TROPICAL FRUITS CROPS

Abstract

Fruit global markets demand greater increasing use of fertilizers and pesticides, leading to higher yield costs and environmental contamination. Microbial-based sustainable technologies could reduce or replace mineral fertilizers while maintaining the current yields at lower ecological costs. Compared to legume and cereal crops, little attention has been given to plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated to fruit trees. During a previous survey for nitrogen-fixing bacteria, isolates were obtained from pineapple, guava, passion fruit and papaya cultivated under organic crop management system. Downstream analysis of 16S rDNA sequences unveiled 23, 7, 1 and 1 strains from the *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Herbaspirillum* genera. Additional biochemical analysis revealed great phenotypic diversity and metabolic versatility, even for bacteria from the same genus. All strains were able to reduce acetylene tested positive for the *nifH* gene (except for one strain), confirming the nitrogen-fixing ability of these bacteria. The ability to solubilize phosphorus on solid medium was positive for 24 and 15 strains, when calcium phosphate and Araxá rock phosphate

were used as P-source, respectively. In addition, all isolates were able to solubilize P (0.2 to 245.2 mg. L⁻¹) in liquid medium containing Araxá P-rock. Nine isolates were positive for indoles in the presence (41.6 to 145.1 µM) and absence (28.5 to 92.1 µM) of tryptophan, respectively. On the other hand, only seven strains were able to solubilize zinc. Taken together, our results showed a high functional diversity among the nitrogen-fixing bacteria reported here and highlight the ecological relevance of *Azospirillum* (α-Proteobacteria) and *Burkholderia* (β-Proteobacteria) as members of the culturable diazotrophic bacterial community associated epiphytically and endophytically with tropical fruit trees.

Keywords: diazotrophs, bioinoculant, P-solubilizing bacteria, plant growth-promoting traits.

1. Introduction

Feeding the increasing world population under accelerated climate changes constitutes a great challenge for the scientific community. A major goal is to reduce the use of chemical fertilizers that are generally harmful to the environment. It is common sense that the inappropriate use of fast reactive fertilizers, mainly of high doses of nitrogen and phosphate, negatively impact the environment by causing eutrophication of water bodies, increasing the greenhouse effects and waste of financial resources (Adesemoye and Kloepper, 2009; Sarwar and Kremer, 1995).

Increasing the use of biological processes as an agricultural input represents a feasible short-term alternative to change the actual agricultural paradigm of food, fiber and energy production. Currently, microbial products and processes formulated as bioinoculants are the best approach to reduce the demands for non-renewable energy sources. Among the sustainable alternatives based on microorganisms, plant growth promoting bacteria (PGPB) is the most studied (Adesemoye and Kloepper, 2009; Bashan et al., 2014).

Beneficial bacteria can promote plant growth and development by various mechanisms that result in increased availability of nutrients (biofertilization effects; e.g. biological nitrogen fixation or solubilization of inorganic compounds). Further, PGPB can change root growth rates and architecture by secreting phytohormones

and other bioactive compounds (biostimulation effect), which modulate energy transduction systems related to nutrient uptake and assimilation. Finally, bioprotection effects against pathogens and increased tolerance against abiotic factors are also well-documented effects of PGPB (Glick, 2012; Krey et al., 2013; Vessey, 2003).

Ecophysiological studies focused in diazotrophic bacteria in association with non-legume plants have been mainly concentrated in cereal and forage grasses (James and Olivares, 1998). One of the first contributions was related with *Beijerinckia* and *Azotobacter* species, which are free-living rhizosphere-associated diazotrophic bacteria (Döbereiner and Campelo, 1971). The genus *Azospirillum* was intensively studied during 70 to 80's decades. *Azospirillum* include gram-negative diazotrophic bacteria, which can display free-living and facultative endophytic behaviors and are often capable to colonize both the surface and the interior of plant roots. Such species have been widely characterized in maize, wheat, rice, sorghum and legumes (Baldani and Baldani, 2005; Day and Döbereiner, 1976; Döbereiner et al., 1976).

The *Azospirillum* era was followed by the discovery of a novel type of association: the endophytic diazotrophic interaction (Döbereiner, 1992). Many bacterial genera isolated from different plant species have been described as diazotrophic endophytes, such as *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, and *Burkholderia*, including those associated with fruit plants (James and Olivares, 1998; Magalhaes Cruz et al., 2001; Pedraza et al., 2007). The *Burkholderia* genus has been greatly studied as promising plant growth promoter, either through nitrogen fixation, phytohormones production, phosphate solubilization and biological control (Baldotto et al., 2010; Estrada-De Los Santos et al., 2001; Magalhaes Cruz et al., 2001).

There are several studies related to the diversity and characterization of nitrogen fixing bacteria in various non-legume crops, such as corn, rice, sugar cane and wheat (Magnani et al., 2010; Souza et al., 2013; Sun et al., 2008; Torres et al., 2008; Ulrich et al., 2008). However, although recognizing the importance of this association, much less is known about the association between diazotrophic bacteria and fruit crops, especially regarding their growth-promoting potential. Beneficial bacteria have been described in several fruit plants (e.g. coconut, mango, orange, banana, pineapple, passion fruit), comprising a wide diversity of

nitrogen-fixing bacteria with great biotechnological potential (Baldotto et al., 2010; Magalhaes Cruz et al., 2001; Pedraza et al., 2007; Tapia-Hernández et al., 2000).

Innovative technologies more self-sustaining in terms of plant nutrition and environmental stress tolerance are demanded for organic and even in conventional tree fruits production systems (Granatstein et al., 2015). Microbial-based technologies can be applied to boost micropropagated, seed or vegetative propagated fruit tree plantlets on pre-plant substrate and nursery stages, as well under field conditions (Baldotto et al., 2010; Olivares et al., 2015). Here we describe a variety of bacterial isolates from tropical fruits through genetic and phenotypic analysis and polyphasic grouping. The detailed information provided about these isolates is essential to achieve provide on farm use of properly elaborated bioinoculants based on diazotrophic bacteria.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial isolates

In a previous biogeographical study of plant growth-promoting bacteria (Santos 2010, unpublished) we obtained 32 bacteria isolates from underground (i.e. rhizosphere, rhizoplane and inner root tissue) and aerial (i.e. stems and leaves surface and inner tissues) compartments associated to fruit tree. These nitrogen-fixing bacteria were isolated from pineapple (10), passion fruit (9) and papaya (8) grown at the Integrated agroecological production system (SIPA) (Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brazil) and 5 isolates were obtained from guava grown in a family farm at (Mazomba, Itaguaí, RJ, Brazil) (Table 1).

These isolates belong to the Culture Collection of the Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) and designated by the suffix UENF followed by six numbers related to isolation information (1st: plant species; 2nd: plant variety; 3rd: plant compartment; 4th: medium used; 5th: dilution obtained; 6th: order). All the isolates were maintained in Dygs liquid medium in glycerol 10% (v/v) at -80 °C. The isolates were grown in modified liquid Dygs medium (g.L⁻¹ composition: glucose 2; bacteriological peptone 1.5; yeast extract 2; K₂HPO₄ 0.5; MgSO₄.7H₂O 0.5 to 1.5 glutamic acid; pH 6.0 and incubated at 30 °C at 150 rpm for 48 hours). The growth cultures were streaked on solid Dygs medium for checking the purity (Baldani et al., 2014).

2.2. SDS-PAGE

Bacterial isolates cultured in Dygs medium for 24 h at 150 rpm were centrifuged at 10 000 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded and the pellet resuspended twice in buffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8) for washing the cells; the pellet (30 mg) was transferred to new tubes, and 1 mL of 1M Tris-HCL at pH 6.8 was added, followed by sonication (15 x for 1 min). Samples were then centrifuged again at 10 000 rpm for 10 minutes and 60 µL of the supernatant were transferred to a new tube of 600 µL, where 60 µL of sample buffer were added and analyzed by SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a discontinuous gel system with 12% polyacrylamide for separation, and 5% for protein concentration; current of 30 mA and constant voltage were used on a mini system-gel (Hoefer miniVE-Vertical Electrophoresis System, Amersham Pharmacia Biotech). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and scanned using the One Touch scanner Visioneer. Molecular weight markers and reference strains *Burkholderia silvatlantica* 103, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *Azospirillum lipoferum* Sp 59, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 and *Azospirillum brasilense* Sp 245 were used. The protein profiles were analyzed with the software GelCompar II(Applied Maths, version 6.0). Matrix data were used to calculate pairwise similarities of the profiles using the Jaccard coefficient. For assembly and construction of similarity dendrogram, the algorithm unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) was used.

2.3. Biochemical API 50 CH/E test

For the biochemical characterization of bacterial isolates, the test kit API 50 CH/E (bioMérieux SA Marcy- l'Etoile/France) was used. This kit evaluates the ability of the isolates to conduct fermentation of 49 carbohydrates and derivatives. To this end, the isolates were cultured in Dygs for 24 hours at 150 rpm. After this period, the isolates were suspended in autoclaved water and adjusted to optical density 1.0; 2 mL of this suspension were added to CHL medium (bioMérieux) and transferred to galleries containing different substrates. Each dome was sealed with a sterile drop of mineral oil and incubated in an environmental chamber at 37 °C. Reads were recorded after 24 h and 48 h after inoculation and eventual production of organic acids during incubation shifts the pH indicator from red to yellow. A binary matrix (1: yes; 0: no) was built with data regarding the growth capacity on a

particular carbon source. This matrix was used to create a UPGMA dendrogram of similarity-method algorithm unweighted pair-group arithmetic mean method and the similarities of the isolates were estimated by simple matching coefficient.

2.4. Molecular Characterization

Bacterial genomic DNA was extracted using the KIAamp kit (QIAGEN) following manufacturer's instructions and quantified in 3000 NanoDrop (Thermo Scientific USA). DNA quality was analyzed using a 0.8% agarose gel stained with gelred. A fragment of the 16S rDNA gene was used to amplify a 1500 bp region for by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492 R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). PCRs were performed using 50 ng of genomic DNA in 50 µL reaction buffer containing 200 µM each dNTPs, 10 x PCR buffer, 500 µM MgCl₂, 0,5 µM. each primer and Taq polymerase (2 U/µL). Amplification was performed in 96-well thermocycler Veriti model (Applied Biosystems), programmed at 95°C for 3 min, 30 cycles of amplification (94°C for 1 min, 55°C for 30s, 72°C for 30s) at 72°C for 10 min. Sequencing reactions were performed using the Big Dye Terminator Sequencing Kit-Cycle Sequencing Ready ABI Prism version 3 (Life Technologies, USA), following manufacturer's instructions. Samples were analyzed on ABI Sequencer model 3130 (Applied Biosystems). 16 rDNA sequences were compared with publicly available sequences at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>). Selected sequences were aligned using ClustalW (version 1.8) (Thompson et al., 1994) the alignment edited to remove the ends of the DNA sequences with the aid of the BioEdit program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The bacterial isolates were assigned to the same species at >98% identity levels. Identity levels lower than 98% allowed the taxonomic affiliation at genus level. Phylogenies were reconstructed using the neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei,1987) implemented in the Mega 6.0 program (Szilagyi-197 Zecchin et al., 2014). Bootstrap analysis was performed with 100 random samples.

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequence data reported in this paper have been deposited in the GenBank nucleotide sequence database under accession numbers KU836499– KU836629.

2.6. *nifH* gene detection

PCR reactions were used to verify the presence of the *nifH* gene in the bacteria genome using the primers PoIF (5'TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC 3') and PoIR (5'ATS GCC ATC ATY TCR GCC GA 3') (Poly et al., 2001). In each reaction were used 200 µM each dNTPs, 1X PCR buffer, 500 µM MgCl₂, 0.5 µM of each primer, Taq polymerase (2 U/ µL) and 50 ng DNA, in a final volume of 50 µL. The amplification conditions were: denaturation at 94 °C for 5 minutes, then 30 cycles (94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 2 minutes) and a final extension step (72 °C for 5 min). The amplification products were inspected on 1.5% agarose gels and for fragments of 360 bp (expected size of the *nifH* gene amplification using the above mentioned primer pair). Bp-100 DNA ladder (Invitrogen) was used as molecular weight marker.

2.7. Acetylene reduction activity and assay (ARA)

All 32 isolates were evaluated for *in vitro* nitrogen fixation through the acetylene reduction assay (ARA) as previously described by Baldani et al., (2014). The strains were grown in flasks with 15 mL capacity containing 5 mL of NFB malate (*Azospirillum* sp.) or JMV mannitol (*Burkholderia* sp.) semisolid media according to Baldani et al. (2014). These flasks were inoculated with 20 µL of the bacterial inoculums suspended in sterile water, adjusted to an optical density (OD) of 1.0 and incubated at 30° C for 48 hours. After pellicle formation, the vials were closed with a sterilized pierceable rubber stopper of subseal type, and with a syringe, 1 mL air was removed and 1 mL of acetylene injected into each vial. The flasks were incubated at 30°C for 1h and 1 mL of the gas phase was analyzed on a gas chromatograph with flame ionization, Perkin Elmer, to determine the ethylene concentration in the sample.

2.8. Phosphorus solubilization in a solid medium

Phosphate solubilization was carried using 1 g.L^{-1} of two P-sources: Araxá rock phosphate - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, and tricalcium phosphate - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, for each medium. Bacterial cultures grown in Dygs medium adjusted to optical density (O.D) of 1.0 were inoculated ($20 \mu\text{L}$) at the center of the petri dish with agar containing Pikovskaya medium. After this procedure, they were incubated at 30°C for 7 days. The ability of the isolates solubilizing Pi was evaluated by measuring the translucent halo, according to Kumar and Narula (1999) formula, in which S.I (solubility index) = halo Diameter (mm)/colony diameter (mm). The test was conducted with three replications.

2.9. Quantification of P solubilization in liquid medium

Pikovskaya liquid medium supplemented with 1 g. L^{-1} the Araxá rock phosphate or $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ was used to quantify the soluble P. Aliquots of $100 \mu\text{L}$ of bacterial cultures grown in Dygs liquid medium were transferred to 50 mL tubes containing Pikovskaya medium and kept for seven days under constant agitation at 30°C at 150 rpm in rotatory shaker. After this period, cultures were centrifuged at 3200 rpm for minutes and the supernatant used for pH determination and quantification of soluble phosphorus. The test was conducted with three replications and linear Pearson correlations were made between the P content and the last pH.

2.10. Zinc oxide solubilization

The zinc solubilization was carried out according to methodology of Intorne et al. 2009. Aliquots of $20 \mu\text{L}$ of bacterial strains cultivated for 24 hours at 30°C in liquid Dygs medium, adjusted to optical density (O.D) of 1.0 were inoculated at the center of the petri dish containing Saravanan medium with agar supplemented with 1 g. L^{-1} of ZnO and incubated at 30°C for 7 days. After this period, the ability to solubilize ZnO was evaluated according to Kumar and Narula (1999), by measuring the translucent halo. The assay was conducted with three replications.

2.11. Indole acetic acid (IAA) production

Bacterial isolates were cultured in liquid Dygs medium for 24 hours at 30°C and transferred ($25 \mu\text{L}$) to test tubes containing 5 mL of the same medium in

the presence and absence of L- tryptophan (100 mg. L⁻¹) before incubation in the dark for 72 h at 30°C, shaking at 150 rpm. The cultures were then transferred to 2 mL tubes and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant transferred to a test tube with 2.0 mL of Salkowski reagent (Sarwar and Kremer, 1995). Tubes were incubated for 30 min in the dark. The production of IAA was evaluated by the presence of pink color in the tubes and the color intensity was determined with a spectrophotometry at a wavelength of 530 nm. IAA concentration was measured using a calibration curve relating absorbance and knowing concentration of IAA. The assay was carried out with three replications and in factorial scheme (nine bacterial isolates) x (absence or presence of L-tryptophan).

2.12. Statistical analysis

The results from ARA, IAA production, zinc and phosphorus solubilization were analyzed and submitted to ANOVA F-test statistical program SAEG (Ribeiro Júnior, 2001) and, when significant, grouped at 5% Tukey test (IAA and zinc data) or Scott - Knott at 5% probability (phosphorus solubilization and ARA data).

3. Results

3.1. 16S rDNA sequencing

The partial sequence of the 16S rDNA gene from the bacteria isolates revealed that they are distributed in four genera: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* and *Pseudomonas* (Table 1). *Azospirillum* was the most prevalent genus in our study (72% of the isolates). In this genus, four different species were detected, which were *A. brasilense*, *A. formosense*, *A. oryzae* and *A. melinis* with 98 to 99% of sequence identity with species deposited in the NCBI data bank. In addition, 10 strains belonging to this genus were assigned only at genus level (90 to 97% identity): UENF 118611, UENF 211211, UENF 211511, UENF 211531, UENF 212211, UENF 311223, UENF 411203, UENF 411204, UENF 412522 and UENF 414521 (Table 1). *Azospirillum* spp. Was isolated from all fruits crops studied, mainly from rhizosphere and rhizoplane.

The second most frequent genus was *Burkholderia* (21.87%), displaying identity values of 95-99%. *B. silvatlantica* species affiliation accounted for ~57.14% of the total *Burkholderia* isolates, which were obtained mainly from pineapple and

passion fruits. These isolates were found associated to roots and shoots as epiphytes and endophytes. In addition, one strain of the *Herbaspirillum* and *Pseudomonas* genus were identified, being affiliated as *Herbaspirillum seropedicae* and *Pseudomonas monteilli* species, both epiphytically associated with papaya, the plant with the greatest diazotrophic bacterial diversity among the tropical crop fruits evaluated here.

Phylogenetic reconstructions of the isolates reported here reveal that they belong to distinct, biologically-meaningful clades (*Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* and *Pseudomonas*) (Fig. 1). In the Beta-Proteobacteria clade, our analysis grouped the papaya isolate and the *H. seropedicae* type strains. Further, we also found a clade with 4 *B. silvatlantica* strains and 3 *Burkholderia* sp. strains, all isolated from pineapple and passion fruit). The Gamma-Proteobacteria clade comprises the strains *P. monteilli* (papaya isolate) partially related to type strains sequences. The top-most cluster comprises Alpha-Proteobacteria representatives of *Azospirillum* species split in two smaller clades, one comprising fourteen strains isolated from all plants, which is more related to *A. formosense* and *A. brasilense* reference strains and; a second, more heterogeneous clade, comprising seven strains related to *A. lipoferum*, *A. zea*, *A. oryzae*, *A. melinis* (although designed as *Azospirillum* sp.). Two strains defined as *Azospirillum* sp. (isolated from papaya plants) appear in separate clades and probably represent new *Azospirillum*-related species.

3.2. Total proteins by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was used to evaluate the relationships between protein profiles of the isolates studied here. The protein fingerprints of the 32 isolates and 5 reference strains yielded nine discrete clusters that delineated at an arbitrary value higher than 60% similarity, with values ranging from 44 to 92 % (Fig. 2). Four strains used, including two reference strains showed unique protein patterns. The most dissimilar bacteria (44%) was *P. monteilli* UENF 311212 (Gamma-Proteobacteria), followed by *H.rubrisubalbicans* HCC 103 and *H. seropedicae* HRC54, both Beta-Proteobacteria, respectively with 50 and 54.8% similarity. Also, *Azospirillum* sp. UENF 212211 (Alfa-Proteobacteria) formed a single branch, dissimilar to all species from the same genus.

The group I clustered UENF 311522, UENF 312201 and the type strain of *A. lipoferum* Sp 59; group II: UENF 114511 and UENF 411202; group III: UENF 414521, UENF 112531 and *A. brasilense* Sp245; group IV: UENF 211531, UENF 311223, UENF 118611, UENF211511 and UENF 311211; group V: UENF 211231, UENF 411201, UENF 111222 and UENF 311211; group VI: UENF 117922, UENF 211211 and UENF 411203, group VII: UENF 411204, UENF 412522, UENF 411211 and UENF 312522, group VIII: UENF 414118 and the reference strain *Burkholderia silvatlantica* 103 and group XI: UENF 111111, UENF 114112, UENF 114121, UENF117111, UENF 114111 (Fig. 2).

The group VIII and IX comprises all representatives of the genus *Burkholderia*. Interestingly, all strains from group IX were isolated from pineapple and showed 67- 92% similarity, being also 65.6% similar to a reference strain of *B. silvatlantica* present in the separated group VIII. In general, the clustering of protein profiles and the phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences were coherent (Table 1, Fig 2).

Representatives of the Alfa-Proteobacteria belonging to the genus *Azospirillum* (groups I to VII) generated complex patterns that were not easy to interpret and compare with the 16S rDNA phylogeny. Only the group II comprise members of the same species (*A. formosense*) and same sub-groups of *Azospirillum* sp. with similarities higher than 70% (groups IV, VI and VII). Heterogeneity of *Azospirillum* species previous assigned by 16S rDNA were observed at Group I (*A. formosense* UENF 311522, *A. brasilense* UENF 312201 and the type strain of *A. lipoferum* Sp 59) with 62% similarity. Group III (*Azospirillum* sp. UENF 4114521, *A. melinis* UENF 112531 and the type strain *A. brasilense* Sp 245) and Group V (*A. formosense* UENF 211231, *A. brasilense* UENF 411201, *A. oryzae* UENF 111222 and *A. formosense* UENF 311211) showed similarities of 64 % and higher than 68%, respectively (Fig. 2).

3.3. Test biochemical Kit API 50 CH/E

The biochemical test using the API Kit 50 CH/E was used to group the 32 bacteria isolates of the tropical fruit tree based on the use of 49 compounds as a carbon sources. None of the isolates was able to metabolize inulin, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate.

Conversely, all isolates successfully metabolized the monosaccharides galactose, D-fructose and glucose.

By clustering the 32 isolates we found 10 groups of similarity between 60% and 98%, displaying great metabolic variability among strains from the same genus and even species (Fig. 3). The isolates UENF-114112 *Burkholderia* sp., UENF 114121 *B. silvatlantica*, UENF 311522 *Azospirillum formosense* and UENF 314221 *H. seropedicae* were not placed in any group. In some groups (e.g. I, V, VII and VIII), bacteria identified by 16S rDNA as *Burkholderia* were grouped with bacteria belonging the group of *Azospirillum* and *P. monteilli*.

3.4. *nifH* PCR amplification

PCR amplifications of the *nifH* gene showed that all but one isolate showed positive amplification of a fragment with 360 bp, which is the expected size for the *nifH* gene amplification using PolF primers (Fig. 4). Of them, 71.87 % belong to the genus *Azospirillum*, while the remaining isolates are of the *Herbaspirillum* and *Burkholderia* genera. The *nifH* gene was not amplified in *Pseudomonas monteilli* UENF 311212 (Fig.4).

3.5. Acetylene reduction Assay (ARA)

All the strains tested were found to grow abundantly in N-free semi-solid medium showing an aerotactic pellicle growth pattern and nitrogenase activity. The ARA rates ranged from 21.9 to 415.7 η moles C₂H₄ per hour per vial (average of 134.8 ± 10.8 η moles C₂H₄/hour/vial) (Fig. 5). Only eleven strains had showed diazotrophic activity higher than the average, being 10 out 11 belonging to *Azospirillum* genus and mainly isolate from rhizosphere/rhizoplane (90.9%). The best ARA activity was obtained for the strains *A. formosense* UENF 311211 and *A. brasilense* UENF 312201 that are root-isolates from papaya (rhizosphere and rhizoplane), followed by all five *Azospirillum* sp. UENF 211211, UENF 211211, UENF 211511, UENF 211531 and *A. formosense* UENF 211231 that are rhizosphere isolates from guava, one endophytic root-*A. oryzae* UENF 111222 isolate from pineapple and two the rhizosphere *A. amazonense* UENF 411202 and *A. brasilense* UENF 411211 plus one rhizoplane - *B. silvatlantica* UENF 414118 isolates from passion fruit (Fig. 5).

3.6. Indole acetic acid production

IAA production was detected in 9/32 isolates; IAA content in DYGS medium without L-tryptophan ranged from 22.50 to 92.17 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ 390 and in medium supplemented with L-tryptophan ranged from 47.57 to 145.18 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ 391 (Table 2). In the presence of tryptophan, *Azospirillum* sp. UENF 211531, *A. formosense* UENF 311211 and *A. brasilense* UENF 411211 showed higher IAA when compared with others. Under absence of tryptophan, IAA detection was higher for *Azospirillum* sp. UENF 211531, *A. formosense* UENF 311211 395 and *A. brasilense* UENF 117222. Most of the strains, all from the genus *Azospirillum* (the majority isolated from the rhizosphere), showed greater IAA production in the presence of tryptophan. Only *Burkholderia* sp. UENF 11111 and *B. silvatlantica* UENF 117111 did not show differential ability to synthesize indoles in the presence or absence of tryptophan, indicating the presence of feedback loops between tryptophan-dependent and independent IAA biosynthetic pathways (Table 2).

3.7. Phosphate of solubilization on solid medium

With regard to the ability of the isolates to solubilize phosphate on solid medium, 75% and 46% of them were able to form a translucent halo in medium supplemented with tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and Araxá rock phosphate $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, respectively (Fig 6). *Azospirillum* sp. UENF 211511 and UENF 212211, *A. amazonense* UENF 311522 and *P. monteilli* UENF 311212 showed the highest solubility index values on P-Calcium source. The two former were respectively isolated from guava rhizosphere and roots, whereas the two latter were isolated from the papaya rhizosphere. *A. formosense* (UENF 312522) (papaya rhizosphere) and *Azospirillum* sp. (UENF 412522) (passion fruit roots) showed the best results for phosphate solubilization from Araxá rock.

3.8. Phosphate of solubilization in liquid medium

From the 32 isolates, 29 were able to solubilize inorganic phosphorus in liquid medium, out of which 20 showed remarkably higher P-label contents than the rest. *Azospirillum* sp. strain UENF 211511, *Pseudomonas monteilli* strain UENF 311212, *Azospirillum formosense* strains UENF 311522 and UENF 312522 showed the greatest phosphate solubilization levels (i.e. 230, 190, 170, 190 420

mg. L⁻¹, respectively). We found some isolates that were unable to solubilize Araxá-P in solid medium but were able to solubilize such P-source in liquid medium (Fig 6 and 7). Further, we found an association between higher soluble P contents in liquid medium and pH decrease (Fig 7).

3.9. Zinc Solubilization

Seven out of 32 bacteria isolates tested were able to solubilize zinc (ZnO) by forming a translucent halo around the colony. They are mainly from *Burkholderia* sp. strain UENF 114111, *B. silvatlantica* strains UENF 117111, UENF 414116 and UENF 414118, *Azospirillum* sp. strains UENF 311223 and UENF 211531; and *A. formosense* strain UENF 311522. *B. silvatlantica* UENF 117111 (endophyte from pineapple leaves) showed the highest Zn-solubilization levels (Table 2).

4.0. Discussion

Diazotrophic bacteria can be found in diverse ecosystems, living in a free state in the soil, colonizing the rhizosphere or associated with different plant body niches, where they can establish symbiosis or form endophytic/epiphytic interactions with the plant hosts. In addition to nitrogen fixation, such bacteria can also produce plant growth regulators and other bioactive compounds; solubilize phosphorus and zinc, chelate iron through siderophore secretion, among other mechanisms that modulate plant growth and development. Taken together, these activities improve several aspects of plant growth and could reduce the use of chemical fertilizers (Somers et al., 2005; Vessey, 2003).

Sequencing of the 16S rDNA of the diazotrophic bacteria isolated from tropical fruit tree plants revealed that the *Azospirillum* genus was the most frequent taxon isolated, being associated with pineapple, guava, papaya and passion fruit in different plant niches (mainly rhizosphere and roots). Further, we were able to identify the species level of several strains, such as *A. formosense*, *A. brasilense*, *A. oryzae* and *A. melinis*.

Burkholderia was the second most frequent genus with major occurrence of *B. silvatlantica* strains. This species was found associated with pineapple and passion fruit, mainly as an epiphyte in aboveground vegetative parts. *H. seropedicae* and *P. monteilli* isolated from the papaya rhizosphere and

rhizoplane were less represented species (each as a single strain). All the species identified at the genus level belong to genera that have been widely recognized as plant-growth promoting bacteria by biofertilization or biostimulation effects (Baldani et al., 2014; Baldotto et al., 2010; Bashan et al., 2014; Estrada-De Los Santos et al., 2001; Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Importantly, all bacteria were isolated from semi-selective semi-solid N-free medium NFb (for *Azospirillum*) and JMV (for *Burkholderia*) by forming an aerotactic pellicle able to reduce acetylene and positive for the nitrogenase structural gene (*nifH*), with one exception.

Previous work reported the isolation and beneficial effects of these bacteria indifferent plant crops including fruit plants (Bashan and De-Bashan, 2010; Magalhaes Cruz et al., 2001; Pedraza et al., 2007; Tapia-Hernández et al., 2000; Weber et al., 1999). Strawberry seedlings inoculated with *A. brasilense* strain REC3 under hydroponic system showed increased shoot and root biomass (Guerrero-Molina et al., 2012). Further, inoculation with *B. silvatlantica* has also been shown to promote growth of rice plants (Alves et al., 2015). (Baldotto et al., 2010) reported a group of isolates that was able to reduce the time of acclimatization of micropropagated pineapple plantlets and increase plant growth rates. Further, one of the elite strains was *B. silvatlantica*, which holds potential for biotechnological application during the transition to environmental conditions (Baldotto et al., 2010).

The relationships between the SDS-PAGE protein profiles, biochemical tests and 16S rDNA sequencing have been widely used in polyphasic approaches for taxonomic affiliation and phylogenetic studies (Coenye et al., 2001; Figueiredo et al., 2009). Our data show reasonable agreement for genus level and contradictory grouping at species level. This can be partially explained by the presence of intraspecific variability present in these isolates. It is noteworthy that these bacteria were isolated from different parts of several fruit crops. Further, the isolates identified for the same species by 16S rDNA had showed variation in the type of soil, nutritional status, and competition with other microorganisms. Such variations may contribute to the differences in protein profiles and C-nutritional requirements of bacteria of the same species. In addition, phylogenetic analysis based on the 16S rDNA for complex genera such as *Burkholderia* and *Azospirillum*, often warrants other molecular methods to confirm taxonomic

affiliations, even at high identity levels (Baldani et al., 1996). Accordingly, the use of the SDS-PAGE is still limited to some bacterial species, such as communities of endophytic bacteria isolated from corn. Finally, 16S rDNA analysis can discriminate isolates that have similar protein patterns (Figueiredo et al., 2009).

The biochemical API kit has been largely used to evaluate microbial metabolic diversity and rapid taxonomic strain identification. However, in this study it was not possible to obtain uniform groups coherent to clades from 16S rDNA phylogenetic analyses. Differences between phenotypic and genotypic analyses have been previously shown, for example when an isolate phenotypically classified as *Pseudomonas fluorescens* was in fact *Enterobacter ludwigii*, as demonstrated by 16S rDNA (Midekssa et al., 2015). Aplevicz et al. (2014) reported the phenotypic and genetic characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from grape; they showed that yeast strains phenotypically characterized by API kit as *Candida pelliculosa*, were in fact *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, these and other works reinforce that phenotypic tests, despite being widely used to classify microorganisms, are often insufficient (or even misleading) to make taxonomic classifications (Truu et al., 1999). It has been long proposed that genotypic characterization is more reliable and informative (Woese, 1987), although we believe that, whenever possible, research groups may benefit from a combination of both methods.

The ability to fix nitrogen has been largely studied in *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, and some *Burkholderia* species, mainly that reported as plant associated (Baldani et al., 2014). The presence of the *nifH* gene in 31 out of 32 strains reported here supports this notion. This gene is also considered a marker used to characterize the ecology and evolution of nitrogen-fixing bacteria (Raymond et al., 2004). Since all tested strains were able to grow in N-free semi-solid, alternative primer pairs will probably be able to amplify the *nifH* from the negative strain reported here. Taken together, the expression of pellicle in semi-solid N-free medium, ARA assay and the presence of the *nifH* gene emphasize the potential of fruit plants benefit for biological nitrogen fixation, a trait that has not been widely explored.

Regarding the physiological traits potentially related to the plant growth promotion effects, the ability of these microorganisms to solubilize P and Zn from mineral sources and synthesize IAA was determined. Most of the isolates that

were able to produce IAA belong to the *Azospirillum* genus, proving what has been described in several papers (Crozier et al., 1988; Kochar and Srivastava, 2012). IAA and other indole compounds with IAA-like activity secreted by the bacteria can have significant biostimulatory effects on plant. Consistent structural changes on the root system include increase in density or length of root hairs, number of lateral root, root water content and in some cases increases in root dry weight (Canellas and Olivares, 2014). Anatomical changes can be paralleled by the activation of plasma membrane H⁺-ATPase coupled secondary uptake of nutrients with positive impact on nutrient use efficiency (Olivares et al., 2015). Increased concentrations of IAA in the presence of tryptophan have been previously reported in *Azospirillum* sp. (Sarwar and Kremer, 1995). Several isolates reported here were able to produce IAA in tryptophan-dependent and independent pathways, which is in agreement with the existence of distinct IAA biosynthesis pathways from independent precursors. Among the isolates reported here, *Azospirillum* sp. strain UENF 211531, from guava rhizosphere, showed the highest indole contents. Around 80% of the bacteria species isolated from the rhizosphere have ability to synthesize IAA and this phenotype is directly related to the availability of root exudates (Costacurta and Vanderleyden, 1995). *B. silvatlantica* UENF 117111, isolated from pineapple leaves, showed the highest ZnO solubilization capacity. Similar results were previously obtained for *Burkholderia cenocepacia* (Pawar et al., 2015). Zinc is required at low concentrations in plant tissues (Iqbal et al., 2010) and is essential for the biosynthesis of lipids, proteins and nucleic acids (Sirohi et al., 2015). In addition, zinc is also involved in the biosynthesis of tryptophan, the precursor of IAA (Domingo et al., 1992).

Another very important mechanism related to PGPB effect is phosphorus solubilization and bioavailability. Bacteria that exhibit this mechanism convert inorganic insoluble phosphate in soluble phosphates, making them available to plants (Busato et al., 2012). We evaluated P-solubility on solid and liquid medium and found that the bacteria *Azospirillum* sp., *A. formosense* and *Pseudomonas monteilli*, respectively isolated from the rhizosphere of guava, roots of papaya and rhizosphere of papaya, showed the highest solubilization indexes. Similar results have been reported for several *Azospirillum* species (Vikram et al., 2007). Other *Azospirillum* species isolated from the sugarcane rhizosphere were described to

produce gluconic acid and solubilize calcium phosphate *in vitro* (Rodriguez et al., 2004).

Different results were obtained for phosphate solubilization from calcium phosphate and Araxá rock phosphate. This contrast can be due to the higher solubility of tricalcium phosphate when compared with rock phosphate (Panhwar et al., 2011). It has also been proposed that liquid medium allowed greater phosphorus solubilization due to the physical state and agitation of the medium, which favored the bacterial growth. Bacteria and fungi inoculated in liquid medium with Araxá apatite showed higher capacity to solubilize phosphorus when the same nutrient is supplemented in solid medium (Souchie, 2005). A negative correlation between pH and amount of soluble P has been shown here and could result from the release of different organic acids by bacteria (Pawar et al., 2015). It has been suggested that gluconic acid and 2- ketogluconic produced by gram-negative bacteria are responsible for Pi solubilization (Marra et al., 2015; Son et al., 2006; Song et al., 2008).

Some isolates reported here showed multiple traits potentially involved with bacterial growth. *B. silvatlantica* UENF 117111 and *Azospirillum* sp. UENF 211531, respectively isolated as an endophyte from pineapple leaves and guava rhizosphere, were able to fix nitrogen, solubilize phosphorus and zinc, and synthesize IAA. The *Azospirillum formosense* strains UENF 211231, UENF 311211 and UENF 411202, respectively isolated from the rhizosphere of guava, papaya and passion fruit. *Azospirillum brasilense* UENF 411211, isolated from passion fruit, in turn, fixed nitrogen, solubilized phosphorus and synthesized IAA. Similarly, one *A. brasilense* strain isolated from pepper was demonstrated to fix nitrogen and synthesize IAA. Chariet al. (2015) also found that *Azospirillum* sp. isolated from several plants was also shown to reduce acetylene, solubilize phosphorus, produce IAA and siderophores.

In this study, it was observed that most of the bacteria highlighted in physiological tests such as acetylene reduction, zinc and phosphate solubilization and production of IAA were isolated from the rhizosphere and rhizoplane of the tropical fruit plants. Several studies have shown that bacteria isolated from the rhizosphere produced more indole compounds and have higher phosphorus solubilization rates than bacteria from other niches (Khalid et al., 2004; Mohite, 2013). Further, the intense bacterial activity at the rhizosphere is often boosted by

large amounts of root exudates, which are carbon sources metabolized by such bacteria.

5.0. Conclusions

In conclusion, our studies indicate that when using malate and mannitol as a C source in semi-solid N-free medium, the predominant culturable diazotrophic bacteria associated with pineapple, guava, papaya and passion fruit were *Azospirillum* and *Burkholderia*. The taxonomic affiliation determined by 16S rDNA analysis was well supported by less precise methods such as protein profiles and biochemical tests. Besides the ability to fix nitrogen, several strains are able to solubilize phosphorus, zinc, and synthesize IAA. Such multifunctional plant growth promoting abilities underscore their biotechnological potential for the formulation of novel bioinoculants that can contribute to a more sustainable management of fruit systems. Nevertheless, inoculant formulations and pilot field experiments are warranted to confirm this hypothesis.

Acknowledgements

This work received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ nº E-26/102.696/2008 and E-26/102.991/2011) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants nº 306577/2014-3). We would like to thank INCT for Biological Nitrogen Fixation for the structural support. This work contains part of PSLR and STS PhD theses, funded by FAPERJ and CAPES fellowships, respectively.

References

- Adesemoye, A.O., Kloepper, J.W., 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology* 85, 1-12.
- Alves, G., de Matos Macedo, A., dos Reis, F., Jr., Urquiaga, S., Reis, V., 2015. Plant growth promotion by four species of the genus *Burkholderia*. *Plant and Soil*, 1-15.
- Aplevicz, K.S., Mazo, J.Z., Ilha, E.C., Dinon, A.Z., 2014. Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 321-327.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* 77, 549-579.
- Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L., Olivares, F.L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., Dobereiner, J., 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International journal of systematic bacteriology* 46, 802-810.
- Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Baldani, V.L.D., 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil* 384, 413-431.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R., 2010. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34, 349-360.
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E., 2010. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy* 108, 77-136.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S., Hernandez, J.-P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil* 378, 1-33.
- Busato, J.G., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost

- enriched with phosphorus solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource technology* 110, 390-395.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1, 11.
- Chari, K.D., Reddy, R.S., Trimurtulu, N., 2015. Screening and Characterization of Diazotrophic Bacterial isolates for Plant Growth Promoting Properties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 704-710.
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R., LiPuma, J.J., 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of clinical microbiology* 39, 642 3427-3436.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology* 21, 1-18.
- Crozier, A., Arruda, P., Jasmim, J.M., Monteiro, A.M., Sandberg, G., 1988. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and environmental microbiology* 54, 2833-2837.
- Day, J.M., Dobereiner, J., 1976. Physiological Aspects of N₂-Fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* Roots. *Soil Biol Biochem* 8, 45-50.
- Doberein.J, Campelo, A.B., 1971. Non-Symbiotic Nitrogen Fixing Bacteria in Tropical Soils. *Plant and Soil*, 457-&.
- Dobereiner, J., 1992. History and New Perspectives of Diazotrophs in Association with Nonleguminous Plants. *Symbiosis* 13, 1-13.
- Dobereiner, J., Marriel, I.E., Nery, M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22, 1464-1473.
- Domingo, A.L., Nagatomo, Y., Tamai, M., Takaki, H., 1992. Free-tryptophan and indole acetic acid in zinc-deficient radish shoots. *Soil Science and Plant Nutrition* 38, 261-267.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., 2001. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and environmental microbiology* 67, 2790-2798.

- Figueiredo, J.E.F., Gomes, E.A., Guimarães, C.T., Lana, U.G.d.P., Teixeira, M.A., Lima, G.V.C., Bressan, W., 2009. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 522-534.
- Glick, B.R., 2012. *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica 2012.
- Granatstein, D., Kirby, E., Ostenson, H., 670 Willer, H., 2015. Global situation for organic tree fruits. *Sci Hortic-Amsterdam*.
- Guerrero-Molina, M.F., Winik, B.C., Pedraza, R.O., 2012. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. *Applied Soil Ecology* 61, 205-212.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Lima, M.L., da Silva, J.F., Olivares, F.L., de Souza, G.A., 2009. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191, 678 477-483.
- Iqbal, U., Jamil, N., Ali, I., Hasnain, S., 2010. Effect of zinc-phosphate-solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna radiata*. *Annals of microbiology* 60, 243-248.
- James, E.K., Olivares, F.L., 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17, 77-119.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology* 96, 473-480.
- Kochar, M., Srivastava, S., 2012. Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *Journal of basic microbiology* 52, 123-131.
- Krey, T., Vassilev, N., Baum, C., Eichler-Löbermann, B., 2013. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. *European Journal of Soil Biology* 55, 124-130.
- Kumar, V., Narula, N., 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 28, 301-305.

- Magalhaes Cruz, L., de Souza, E.M., Weber, O.B., Baldani, J.I., Dobereiner, J., Pedrosa Fde, O., 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and environmental microbiology* 67, 2375-2379.
- Magnani, G.S., Didonet, C.M., Cruz, L.M., Picheth, C.F., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and molecular research : GMR* 9, 250-258.
- Marra, L.M., de Oliveira-Longatti, S.M., Soares, C.R., de Lima, J.M., Olivares, F.L., Moreira, F.M., 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 46, 367-375.
- Midekssa, M.J., Loscher, C.R., Schmitz, R.A., Assefa, F., 2015. Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 9, 1637-1648.
- Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition* 13, 638-649.
- Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P., 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci Hortic-Amsterdam* 183, 100-108.
- Panhwar, Q.A., Radziah, O., Zaharah, A.R., Sariah, M., Razi, I.M., 2011. Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India* 32, 607-612.
- Pawar, A., Ismail, S., Mundhe, S., Patil, 720 V., 2015. Solubilization of insoluble zinc compounds by different microbial isolates in vitro condition. *International Journal of Tropical Agriculture* 33, 865-869.
- Pedraza, R.O., Motok, J., Tortora, M.L., Salazar, S.M., Díaz-Ricci, J.C., 2007. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant and Soil* 295, 169-178.
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Monrozier, L.J., 2001. Comparison of *nifH* Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with

- Contrasting Properties. *Applied and environmental microbiology* 67, 2255-2262.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E., 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* 21, 541-554.
- Ribeiro Júnior, J., 2001. *Análises estatísticas no SAEG*. Viçosa: UFV 301.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., Bashan, Y., 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Die Naturwissenschaften* 91, 552-555.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406-425.
- Sarwar, M., Kremer, R.J., 1995. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and soil* 172, 261-269.
- Sirohi, G., Upadhyay, A., Srivastava, P.S., Srivastava, S., 2015. PGPR mediated Zinc biofertilization of soil and its impact on growth and productivity of wheat. *Journal of soil science and plant nutrition* 15, 202-216.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., Vanderleyden, J., 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid 744 biosynthesis. *Applied and environmental microbiology* 71, 1803-1810.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S., Heo, M.S., 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R- isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource technology* 97, 204-210.
- Song, O.-R., Lee, S.-J., Lee, Y.-S., Lee, S.-C., Kim, K.-K., Choi, Y.-L., 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 151-156.
- Soucie, e.a., 2005. *Notas Científicas Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 40, 1149-1152.
- Souza, S.A., Xavier, A.A., Costa Costa, M.R., Cardoso, A.M., Pereira, M.C., Nietsche, S., 2013. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Ana' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and molecular biology* 36, 252-264.

- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 487-506.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., Song, W., 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol* 55, 415-424.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., Galli-Terasawa, L.V., 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express* 4, 26.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M., Jimenez-767 Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramirez, L., 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial ecology* 39, 49-55.
- Torres, A.R., Araujo, W.L., Cursino, L., Hungria, M., Plotegher, F., Mostasso, F.L., Azevedo, J.L., 2008. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. *Journal of microbiology* 46, 373-379.
- Truu, J., Talpsep, E., Heinaru, E., Stottmeister, U., Wand, H., Heinaru, A., 1999. Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. *Journal of microbiological methods* 36, 193-201.
- Ulrich, K., Ulrich, A., Ewald, D., 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS microbiology ecology* 63, 169-180.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.
- Vikram, A., Alagawadi, A.R., Krishnaraj, P., Kumar, K.M., 2007. Transconjugation studies in *Azospirillum* sp. negative to mineral phosphate solubilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1333-1337.
- Weber, O., Baldani, V., Teixeira, K.d.S., Kirchhof, G., Baldani, J., Dobereiner, J., 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210, 103-113.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.

Table 01: Distribution of partially identified 16S rDNA sequences the bacterias isolated the fruit tree, pineapple, guava, papaya and passion fruit.

Strain identification	Fruits	Plant tissue and site the colonization the bacteria	Identification based on ¹ 16S RNA gene	Max ident ² (%)	bp	Accession ⁴ number
UENF 117922	Pineapple	Leaf/endophyte	<i>Azospirillum brasilense</i>	98	1340	NR 042845.1
UENF 111111	Pineapple	Rhizosphere	<i>Burkholderia sp.</i>	97	1323	NR 108 706.1
UENF 111222	Pineapple	Rhizosphere	<i>Azospirillum oryzae</i>	98	1295	NR 117482.1
UENF 112531	Pineapple	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum melinis</i>	99	1146	NR 0430483 1
UENF 114111	Pineapple	Stem/ epiphytic	<i>Burkholderia sp.</i>	97	1322	NR 108 706.1
UENF 114112	Pineapple	Stem/ epiphytic	<i>Burkholderia sp.</i>	95	1118	NR 118 0777.1
UENF 114121	Pineapple	Stem/ epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	99	1297	NR 043306.1
UENF 114511	Pineapple	Stem/ epiphytic	<i>Azospirillum oryzae</i>	98	1259	NR 117482.1
UENF 117111	Pineapple	Leaf/endophyte	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	99	1324	NR0433306-1
UENF 118611	Pineapple	Pseudo-stem	<i>Azospirillum sp.</i>	91	990	NR 11 7483.1
UENF 211211	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	91	754	NR 11 7483.1
UENF 211231	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	99	1236	NR 11 7483.1
UENF 211511	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	97	1073	NR 114057.1
UENF 211531	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	95	1095	NR 11 7483.1
UENF 212211	Guava	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	95	680	NR 11 7483.1
UENF 311211	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	99	1186	NR 11 7483.1
UENF 311212	Papaya	Rhizosphere	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99	1273	NR 024910. 1
UENF 311223	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	94	1095	NR 11 7483.1
UENF 311522	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	99	1240	NR 11 7483.1
UENF 312201	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum brasilense</i>	98	1236	NR114057.1
UENF 312221	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum brasilense</i>	99	1047	NR114057.1
UENF 312522	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum formosense</i>	98	1294	NR 11 7483.1

UENF 314221	Papaya	Stem/epiphytic	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	98	1411	NR 1141442.1
UENF 411201	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum brasilense</i>	98	1206	NR 0422845.1
UENF 411202	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	98	1268	NR 11 7483.1
UENF 411203	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	96	1000	NR 11 7483.1
UENF 411204	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	96	1072	NR 11 7483.1
UENF 411211	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum brasilense.</i>	98	1243	NR 0422845.1
UENF 412522	Passion fruit	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	95	1419	NR 11 7483.1
UENF 414116	Passion fruit	Stem/ epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	99	1383	NR 0433061
UENF 414118	Passion fruit	Stem/ epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	99	1523	NR 0433061
UENF 414521	Passion fruit	Stem/ epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	91	558	NR 102 897.1

¹Organism with the partial 16S rDNA sequence most homologous to that of the fruit tree isolate.

²Percentage of sequence identity between the sequence of fruit tree isolate and a related organism.

³Accession number of the related organism sequence.

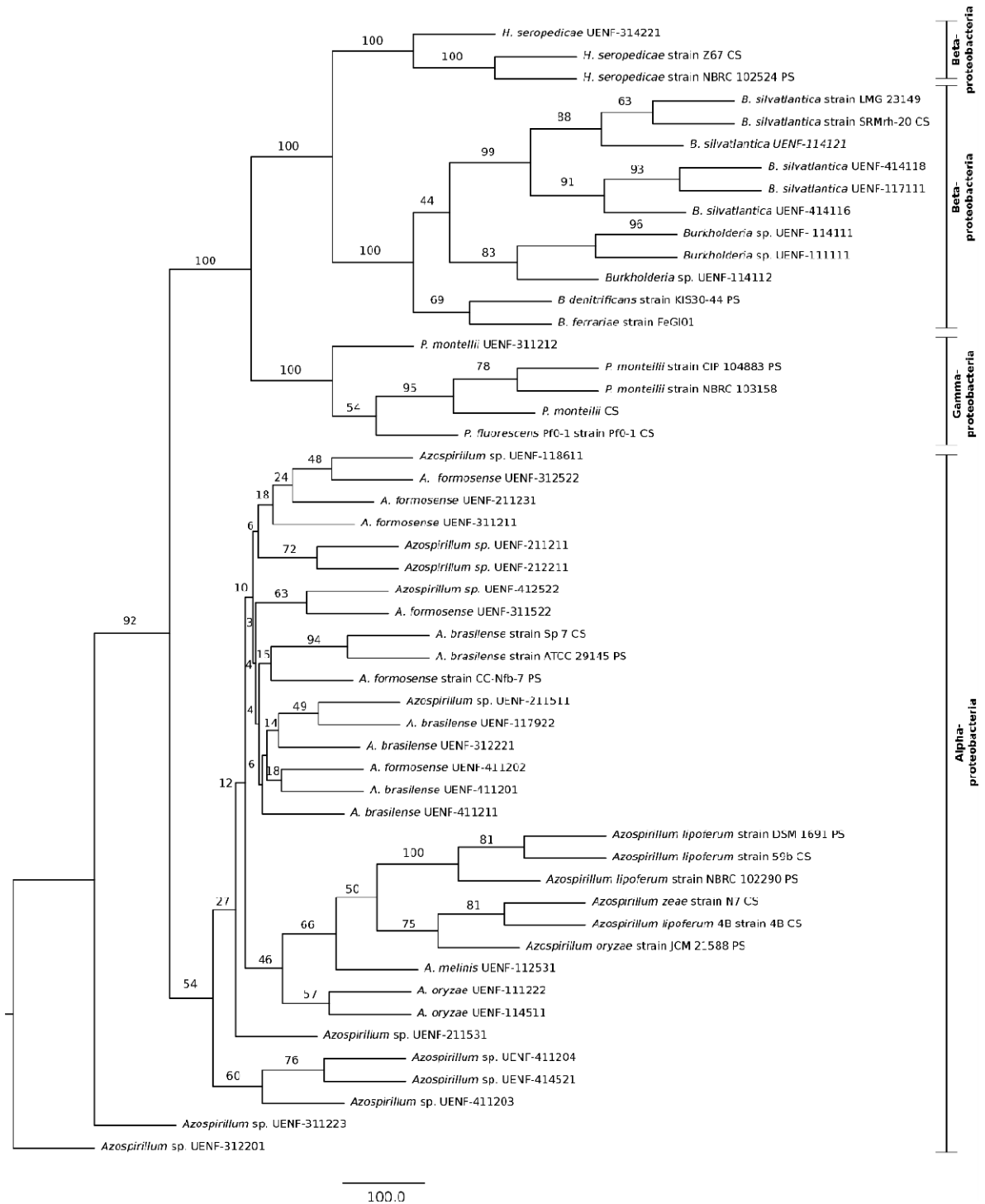


Figure 1- Phylogenetic tree based on the 16S ribosomal DNA sequences of 32 bacteria isolates the fruit tree tropical and the strains references. The tree were constructed using Neighbor-Joining using MEGA 6 software. Bootstrap values (n=100) are displayed.

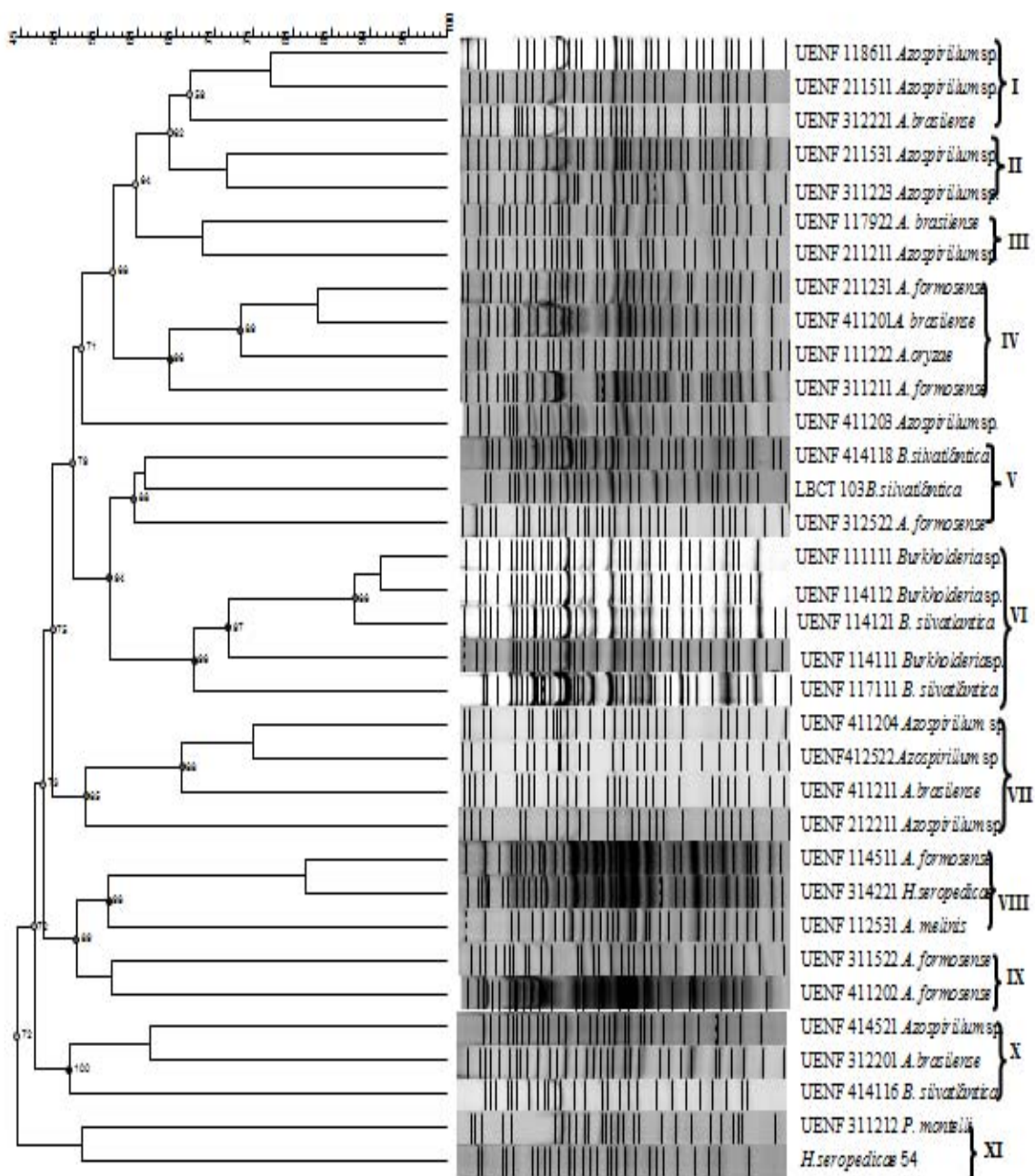


Figure 2 : Dendrogram similarity of the protein profile of 32 bacterial isolates isolated from fruit; papaya, pineapple, guava and passion generated by the UPGMA algorithm and Jaccard similarity matrix.

Optimization: 0.5%

Tolerance: 1%

Quality Measure Groups: cophenetic Correlation.

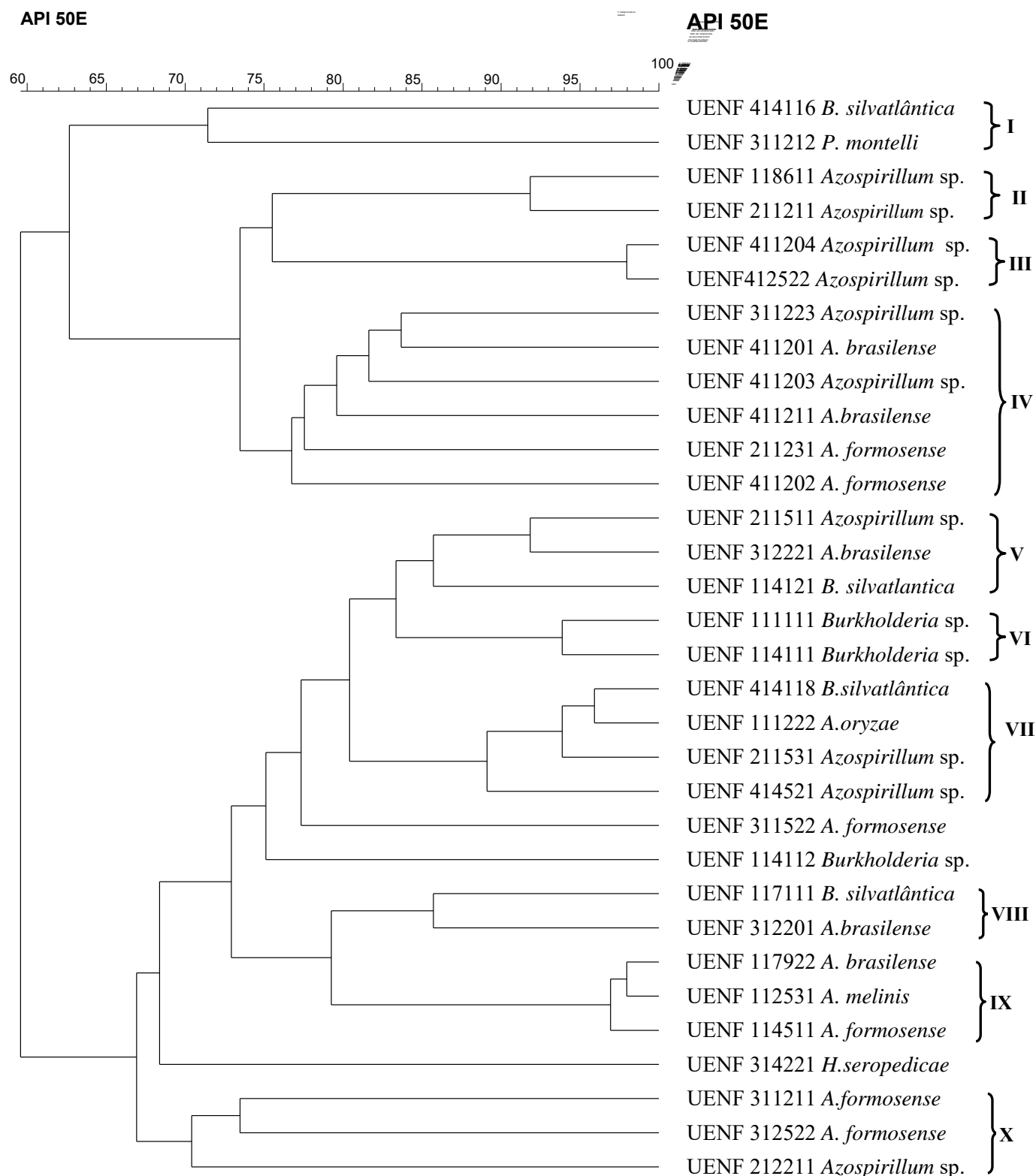


Figure 3: Dendrogram similarity of the biochemical profile of 32 bacterial isolates isolated from fruit; papaya, pineapple, guava and passion fruit generated by the UPGMA algorithm and similarity matrix calculated by the index "Simple Matching" from the use of carbon sources API 50 CH/E. system.

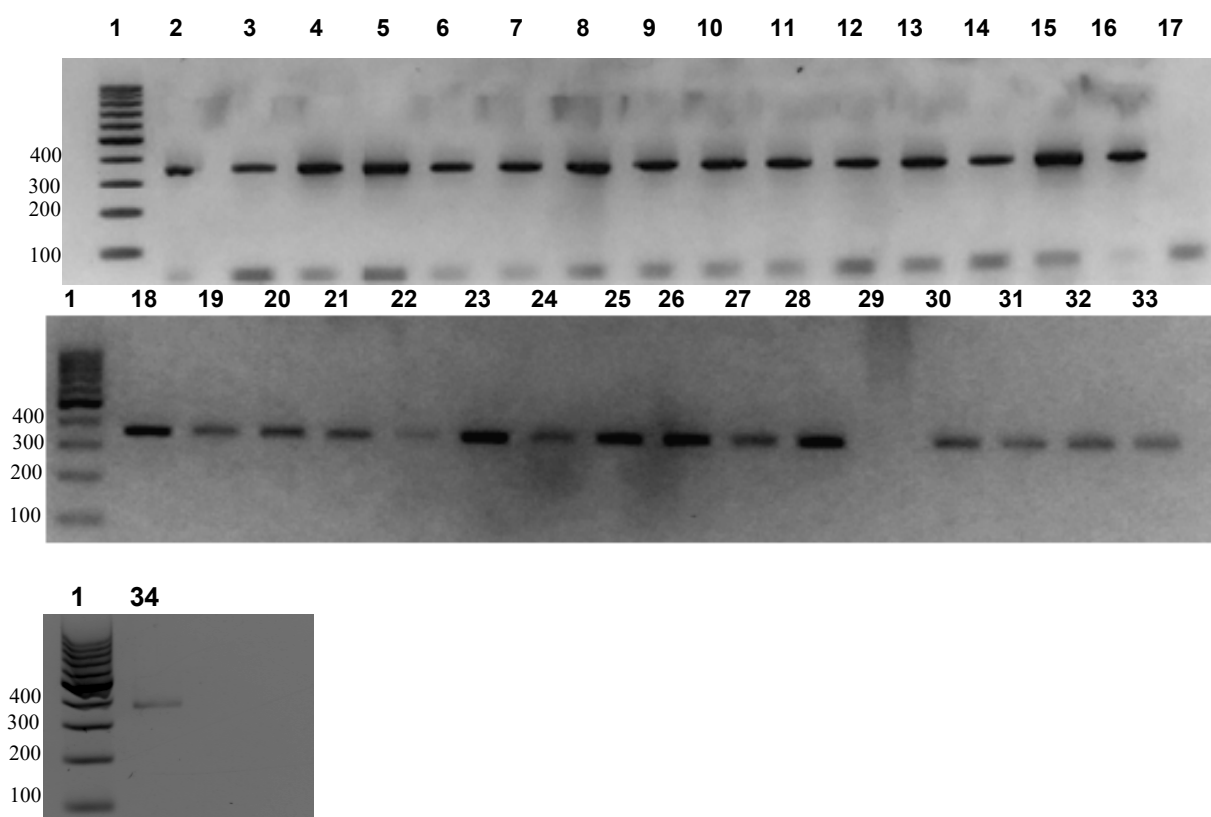


Figure 4: Amplification of *nifH* gene using primers PolF and PolR the 16 bacteria isolated from fruit tree 1- molecular marker, 2-UENF 112531 (*A.melinis*), 3- UENF 114121(*B. silvatlantica*), 4- UENF 117111 (*B. silvatlantica*), 5- UENF 118611 (*Azospirillum* sp.), 6- UENF 311211(*A.formosense*), 7- UENF 312201 (*A.brasilense*), 8- UENF 312221(*A. brasilense*), 9- UENF 312522 (*A. formosense*), 10- UENF 411201(*A. brasilense*), 11- UENF 411202 (*A.formosense*), 12- UENF 411203 (*Azospirillum* sp.), 13- UENF 411204 (*Azospirillum* sp.), 14- UENF 411211 (*A. brasilense*), 15- UENF 414116 (*B. silvatlantica*),16- UENF 414118 (*B. silvatlantica*),17- *E. coli* (negative control) 18-UENF-117222 (*A.brasilense*), 19-UENF 111111(*Burkholderia* sp.), 20-UENF 111222 (*A.oryzae*), 21-UENF114111 (*Burkholderia* sp.), 22-UENF 114112 (*Burkholderia* sp.), 23-UENF 114511(*A.oryzae*), 24-UENF 211211(*Azospirillum* sp.),25-UENF 211231(*A.formosense*), 26-UENF 211511(*Azospirillum* sp.), 27-UENF 21151 (*Azospirillum* sp.), 28-UENF 212211 (*Azospirillum* sp.), 29-UENF 311212 (*P.monteilli*), 30-UENF 311223 (*Azospirillum* sp.), 31-UENF 3115222 (*A.formosense*), 32-314221(*H.seropedicae*), 33-UENF 412522 (*Azospirillum* sp.) and 34- UENF-414521 (*Azospirillum* sp.).

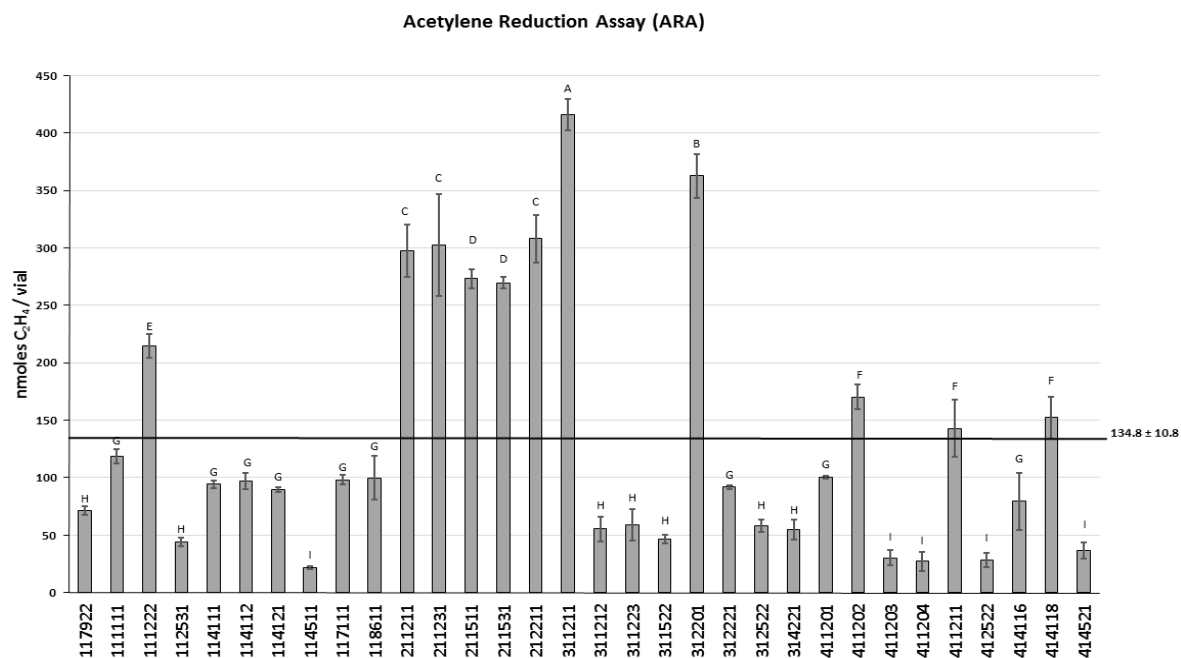


Figure 5 : Nitrogenase activity of 32 bacteria isolates from four tropical fruits in N-free semi-solid medium NFb (*Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* sp. and *Pseudomonas* sp.) and N-free semi-solid medium JMV (*Burkholderia* spp.) after 48 h growth and evaluated by acetylene reduction assay (ARA). Data represent mean of 3 replicates grouped by Scott-Knott test at 5% probability.

Table 2: Plant growth promoting characteristics of the isolates the fruit three: pineapple, guava, papaya and passion fruit.

Strain identification	Fruit	Plant tissue and site the colonization the bacteria	Identification based on 16S RNA gene	FBN		Gene <i>nifH</i>	Indole production (µg/ml)		Solubilization Index (S.I) the OZn
				NFb	JMV		Absence tryptophan	Presence tryptophan	
UENF 117922	Pineapple	Leaf/endophyte	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	-	+	79,47 aA	105,98 bA	-
UENF 111111	Pineapple	Rhizosphere	<i>Burkholderia sp.</i>	-	+	+	53,60 bcdA	47,73 dA	-
UENF 111222	Pineapple	Rhizosphere	<i>Azospirillum oryzae</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 112531	Pineapple	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum melinis</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 114111	Pineapple	Stem/epiphytic	<i>Burkholderia sp.</i>	-	+	+	-	-	2,40 d
UENF 114112	Pineapple	Stem/epiphytic	<i>Burkholderia sp.</i>	-	+	+	-	-	-
UENF 114121	Pineapple	Stem/epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	-	+	+	-	-	-
UENF 114511	Pineapple	Stem/epiphytic	<i>Azospirillum oryzae</i>	+	-	+	22,50 dB	40,75 dA	-
UENF 117111	Pineapple	Leaf/endophyte	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	-	+	+	33,18 cdA	41,70 dA	3,40 a
UENF 118611	Pineapple	Pseudo-stem	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 211211	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 211231	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	+	-	+	47,73 bcdB	78,84 cA	-
UENF 211511	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 211531	Guava	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	92,17 aB	145,18 aA	2,23 e
UENF 212211	Guava	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 311211	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	+	-	+	79,57 aB	116,67 bA	-
UENF 311212	Papaya	Rhizosphere	<i>Pseudomonas monteilii</i>	+	-	-	-	-	-
UENF 311223	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	3,00 b
UENF 311522	Papaya	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	+	-	+	-	-	2,25 e
UENF 312201	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 312221	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 312522	Papaya	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum formosense</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 314221	Papaya	Stem/ epiphytic	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 411201	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 411202	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum formosense</i>	+	-	+	38,20 bcdB	50,27 dB	-

UENF 411203	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 411204	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 411211	Passion fruit	Rhizosphere	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	-	+	40,74 bcdB	114,39 bA	-
UENF 412522	Passion fruit	Roots/epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
UENF 414116	Passion fruit	Stem/epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	-	+	+	-	-	2,70 c
UENF 414118	Passion fruit	Stem/epiphytic	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	-	+	+	-	-	2,98 d
UENF 414521	Passion fruit	Stem/epiphytic	<i>Azospirillum sp.</i>	+	-	+	-	-	-
Média								68,25	2,69
CV(%)								8,6	1,34

Means followed by the similar letter, lower case in the column and uppercase on the line, do not differ by Tukey test at 5% probability.

- Not detected.

+ Detected.

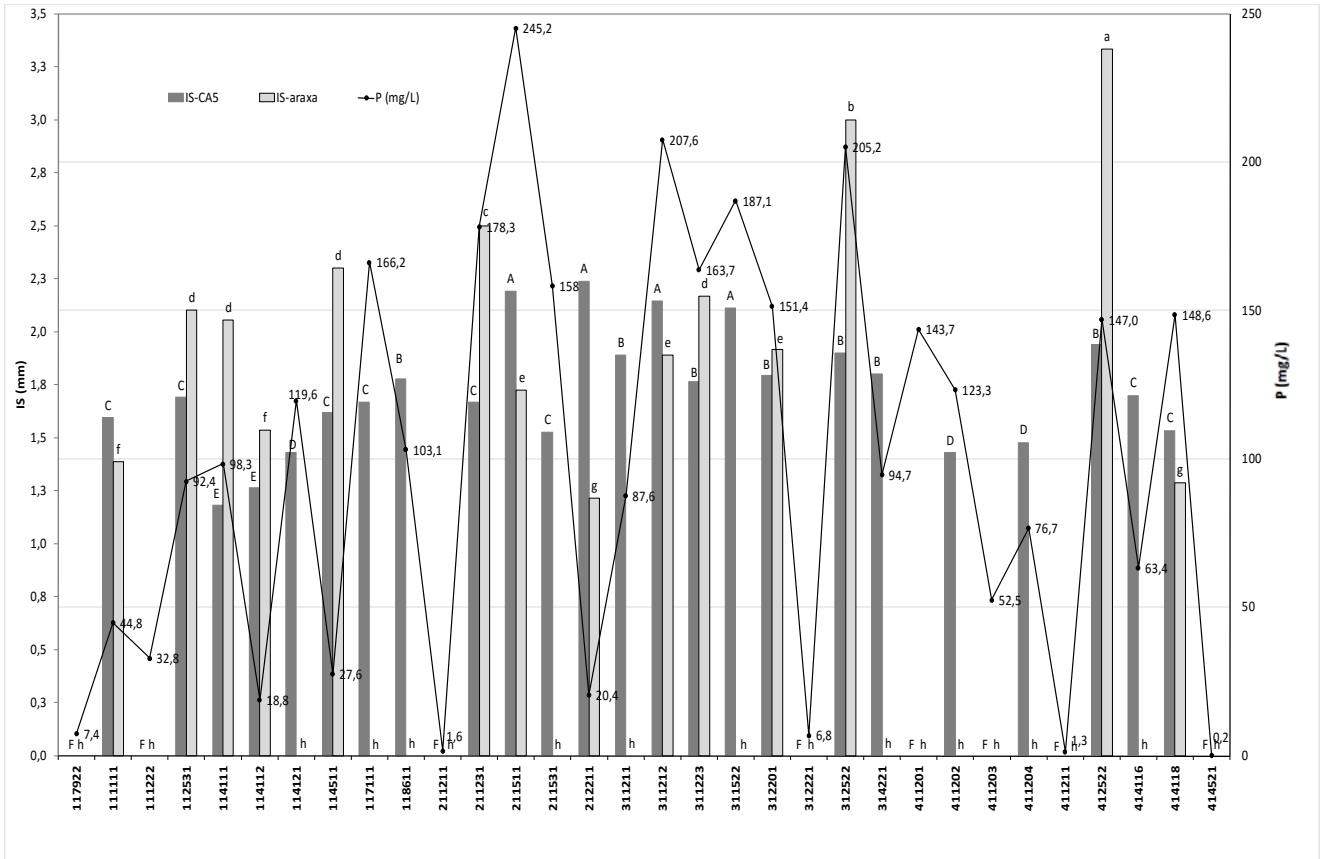


Figure 6 . Relationship between P-contents in Pikovskaya liquid medium and solubilization index in the same solid medium obtained using Calcium phosphate Letters (capital letter) or Araxá rock phosphate (lower case) at 7 days after inoculation with 32 bacteria strains tested. Similar capital letters for P source $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and lower case $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ did not differ among themselves by the Scott-Knott test at 5% probability.

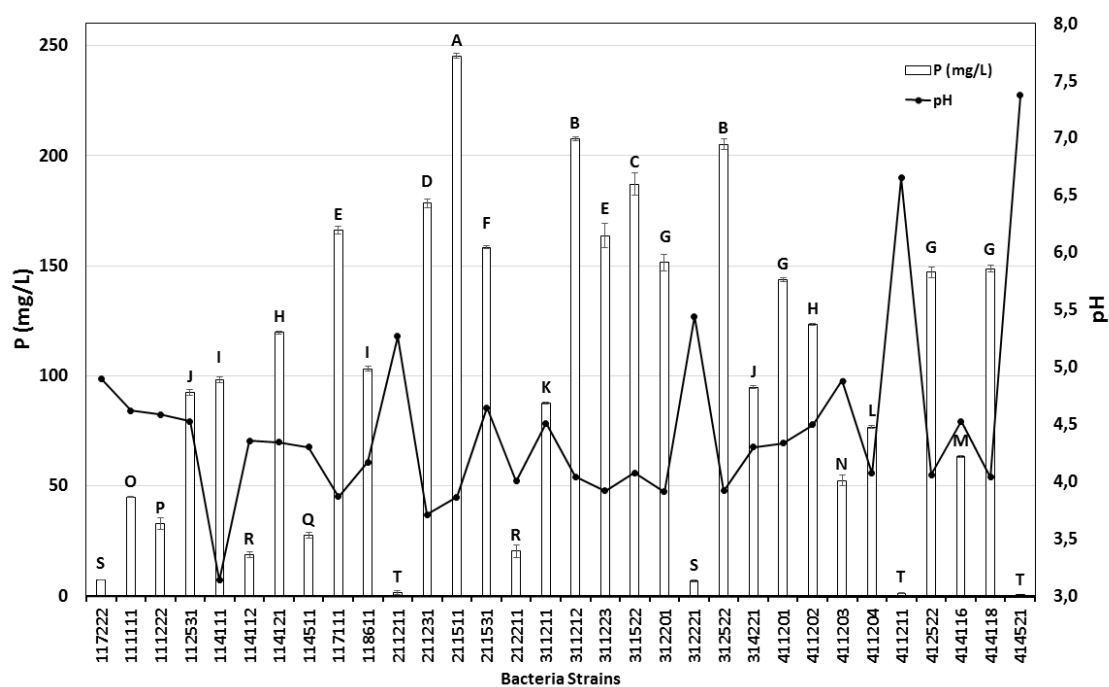


Figure 7. Phosphorus contents in Pikovskaya liquid medium using Araxá rock phosphate as a P-source at 7 days after inoculation with 32 bacteria strains (bars). In addition, final pH of the medium after P-solubilization was shown (line). Data are means of three replicates for each bacteria strain. Similar letters did not differ among themselves by Scott-Knott tested with 5% of probability.

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E A ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FRUTÍFERAS TROPICAIS

Resumo

O uso de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento vegetal tem sido muito estudado em virtude dos benefícios que esses microrganismos proporcionam às plantas, representando uma alternativa ao uso dos fertilizantes minerais. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação homóloga de diferentes bactérias diazotróficas (25 estirpes avaliadas) na promoção do crescimento de plântulas de abacaxi, goiaba, mamão e maracujá em quatro ensaios independentes, respectivamente com 10, 5, 8 e 5 estirpes bacterianas testadas. Ademais, avaliou-se a interação estrutural bactéria/planta em maracujá e goiaba. Os ensaios evidenciaram o potencial diferencial de promoção do crescimento das bactérias em suas respectivas plantas hospedeiras. Em plântulas micropropagadas de abacaxi cv. Smoth Cayenne (120 dias após inoculação) em casa de vegetação, as bactérias mais promissoras foram *B. silvatlantica* UENF 117111, *Burkholderia* sp. UENF 111111 e *A. oryzae* UENF 114511 com incrementos de massa fresca variando de 154 a 361,5% e massa seca de 231,8 a 442,8% em relação a plantas controle. Para plântulas oriundas de sementes de goiaba cv. Paluma avaliadas *in vitro*, todos os isolados testados afetaram positivamente taxas de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento total. Em casa-de-vegetação, o isolado *Azospirillum* sp. UENF 211531 destacou-se em relação aos outros isolados e o controle não inoculado

com incrementos de biomassa entre 71,5 e 82,9%. Os resultados para mamão híbrido UCO1(Formosa) em casa de vegetação aos 28 dias após a inoculação evidenciaram o potencial das estirpes *A. brasilense* UENF 312221, *Azospirillum* sp. UENF 311223 e *A. formosense* UENF 311522 no desenvolvimento dessas plantas com incrementos entre 166,6 e 319,2 % e 111,8 e 235,3%, respectivamente para massa fresca e seca. Resultados mais consistentes foram obtidos para as estirpes *A. formosense* UENF 411202 e *A. brasilense* UENF 411211 para plantas de maracujá em casa de vegetação inoculadas com incrementos variáveis entre 100 e 220% com relação a plantas controle. Estudos de microscopia para maracujá e goiaba evidenciaram, respectivamente a capacidade dos isolados *A. brasilense* estirpe UENF 411211 e *Azospirillum* sp. estirpe UENF-211531 de colonizarem o eixo radicular destas plantas.

Palavras-chave: frutíferas tropicais, BPCP, promoção de crescimento, colonização.

Abstract

The use of diazotrophs in promoting plant growth has been extensively studied because of the benefits these microorganisms provide to plants, representing an alternative to the use of mineral fertilizers. The aim of this study was to evaluate the effect of annual inoculation of different diazotrophs (25 strains evaluated) in promoting the growth of pineapple seedlings, guava, papaya and passion fruit in four independent trials with respectively 10, 5, 8 and 5 tested bacterial strains. In addition, we evaluated the structural bacterium-plant interaction in passion fruit and guava. The tests showed the differential potential to promote growth of bacteria in their host plants. In plantlets of pineapple cv. Smooth Cayenne (120 days after inoculation) in the greenhouse, the most promising bacteria were *B. silvatlantica* UENF 117111, *Burkholderia* sp. UENF 111111 and *Azospirillum oryzae* UENF 114511 increments of fresh mass ranging from 154 to 361.5% and dry weight from 231.8 to 442.8% compared to control plants. For plantlets from guava seeds cv. Paluma evaluated *in vitro*, all isolates tested positively affected the germination rates, germination speed index and length. In the greenhouse, isolated *Azospirillum* sp. UENF 211531 highlighted in relation to other isolates and the uninoculated control in increments of biomass between 71.5 and 82.9%. The results for hybrid papaya UCO1 (Formosa) in the greenhouse at 28 days after inoculation showed the potential of strains *A. brasilense* UENF 312221, *Azospirillum* sp. UENF 311223 and *A. formosense* UENF 311522 in the development of these plants with increments between 166.6 and 319.2% and 111.8 and 235.3%, respectively, for fresh and dry. More consistent results were obtained for the *A. formosense* strains UENF 411202 and *A. brasilense* UENF 411211 for passion fruit plants in greenhouse inoculated with increments ranging from 100 to 220% compared to control plants. Studies in microscopy for passion fruit and guava respectively showed the ability of the isolated *A. brasilense* strain UENF 411211 and *Azospirillum* sp. UENF 211531 strain colonizing the root axis of these plants.

Keywords: tropical fruit, BPCP, growth promotion, colonization.

1 Introdução

Bactérias diazotróficas têm sido usadas na agricultura como alternativa à redução do uso de fertilizantes minerais. Essas bactérias, além de fixarem nitrogênio atmosférico, apresentam vários outros mecanismos, como solubilização de fósforo, produção de ácido indol acético (AIA) e de sideróforos e também atuam no controle biológico, por isso denominando-se bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (Compant et al., 2010; Schroth, 1981). Elas têm sido amplamente encontradas em associação com diversas espécies vegetais de interesse agrícola, como cana-de-açúcar, soja, milho, arroz, tomate, morango, coqueiro, banana, abacaxi e maracujá (Bashan e De-Bashan, 2010; Magalhaes Cruz et al., 2001; Pedraza et al., 2007; Souza et al., 2013).

Diversos gêneros têm sido isolados dessas plantas, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum* (Menaka, 2013; Weber et al., 2001). Dentre esses, *Burkholderia* e *Azospirillum* se destacam em muitos estudos, uma vez que esses dois gêneros apresentam grande potencial na promoção de crescimento e também na produtividade de várias espécies de interesse agrônômico e ecológico (Bashan e De-Bashan, 2010, Beneduzi et al., 2013).

A promoção de crescimento de plantas por esses dois gêneros está relacionada com os mecanismos de solubilização de fósforo, controle biológico, resistência a estresse abiótico e também pela capacidade que apresentam em produzir fitormônios que favorecem o crescimento das raízes, contribuindo com maior absorção de água e nutrientes (Bashan et al., 2004; Dobbelaere et al., 2001; Masciarelli et al., 2013; Bernabeu et al., 2015; Castanheira et al., 2016).

A associação das bactérias BPCP com as plantas pode favorecer o crescimento dessas de várias formas, como aumento da porcentagem de germinação das sementes, aumento das raízes laterais, comprimento de raízes, aumento da biomassa da parte aérea e controle biológico (Chamam et al., 2013; Kang et al., 2012; Kochoni et al., 2013). Devido a esses benefícios, essas bactérias já são usadas como bioinoculantes e também vêm sendo muito estudadas na inoculação de várias espécies de gramíneas e leguminosas (Guimarães et al., 2013; Mehnaz, 2015).

Entretanto, poucos estudos têm dado destaque à inoculação de bactérias em frutíferas tropicais. Tal fato revela a necessidade de aprofundamento nas pesquisas, principalmente pelo potencial que estas bactérias têm de contribuir para a redução parcial do uso de fertilizantes, do desenvolvimento das mudas, redução do tempo em viveiros e, conseqüentemente, a redução dos custos de produção.

Nesse cenário, o objetivo desse trabalho foi avaliar a promoção de crescimento de frutíferas por bactérias isoladas das mesmas e avaliar a interação estrutural da bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe UENF 411211 e *Azospirillum* sp. estirpe UENF 211531, respectivamente para plântulas de maracujazeiro e goiabeira *in vitro*, por terem apresentado promoção de crescimento dessas plantas em casa de vegetação.

2 Material e métodos

2.1 Origem e cultivo de isolados

Nos ensaios de promoção do crescimento vegetal foram testadas vinte e cinco estirpes bacterianas pertencentes à bacterioteca do laboratório de biologia celular e tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Estas bactérias foram obtidas de várias partes de goiabeira, abacaxizeiro, mamoeiro e maracujazeiro, em trabalho anterior por Santos, (2008). Essas três últimas foram oriundas da área do sistema integrado de Produção Agroecológica, Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ. Os isolados de goiaba foram obtidos do sítio Mazomba, propriedade particular, localizado no Município de Itaguaí, RJ. (Santos, 2008).

Todas as estirpes avaliadas no presente estudo foram caracterizadas como diazotróficas, através de ensaios de fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido e análise de redução de acetileno (NFb- *Azospirillum* sp. e JMV- *Burkholderia* sp.). Além disso, a caracterização fisiológica mostrou respostas distintas destes isolados aos ensaios de solubilização de fósforo e zinco e produção de ácido indol acético, sendo que as mesmas também foram identificadas através do sequenciamento do 16S rDNA como *Azospirillum* (23 estirpes), *Burkholderia* (7 estirpes), *Herbaspirillum seropedicae* (1 estirpe) e *Pseudomonas monteilli* (1 estirpe) (Tabela 1).

Os isolados usados nestes estudos foram conservados em meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) em glicerol (1:1 v/v) e para serem utilizados nos ensaios seguintes foram cultivados em meio DYGS líquido por 48 horas a 30°C a 150 rpm.

O potencial dessas estirpes como candidatas a compor bioinoculantes em plantas foi realizado em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação, a partir de sementes e mudas de abacaxi, mamão, goiaba e maracujá.

2.2 Efeito de promoção de crescimento de plântulas micropropagadas de abacaxizeiro

Plântulas micropropagadas de abacaxi cv. Smooth Cayenne (*Ananas comosus* L.), obtidas do Laboratório Biomudas, crescidas em frascos contendo meio MS (Murashige and Skoog, 1962), foram inoculadas com 100 µL de cada suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^8 células mL⁻¹. Foram testadas 10 estirpes de bactérias isoladas de plantas de abacaxi: *Burkholderia silvatlantica* (UENF 117111 e UENF 114121), *Burkholderia* sp. (UENF 111111, UENF 114111 e UENF 114112), *Azospirillum oryzae* (UENF 114511 e UENF 111222), *Azospirillum brasilense* UENF 117922, *Azospirillum melinis* UENF 112531 e *Azospirillum* sp. UENF 118611.

Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em sala de cultivo por 7 dias, a 27° C, com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro e intensidade luminosa de 100 lux. O ensaio foi montado em blocos inteiramente casualizados e com 11 tratamentos (10 isolados de abacaxi e controle não inoculado) com três repetições. Depois desse período, as plantas foram transferidas dos frascos contendo meio MS para vasos plásticos de 500 mL contendo substrato Plantmax® autoclavado, sendo transferidas em seguida para casa de vegetação, onde permaneceram por 120 dias até serem avaliadas quanto ao acúmulo de biomassa radicular e da parte aérea.

2.4 Avaliação de bactérias em mudas do mamoeiro (*Carica papaya*) quanto ao potencial de promoção do crescimento vegetal

Sementes de mamão (*Carica papaya*) do híbrido UC01 (Formosa) foram desinfestadas e depois transferidas para bandejas de isopor de 96 células contendo substrato Plantmax® autoclavado e transferidas para casa de

vegetação. Após 30 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 250 mL contendo o substrato Plantmax® autoclavado.

Após 17 dias do transplântio para os vasos, realizou-se a inoculação de 1ml de suspensão das bactérias contendo 10^8 células. mL⁻¹, sendo testadas 8 estirpes previamente isoladas de plantas de mamão, como descrito a seguir: *Azospirillum formosense* (UENF 311211, UENF 311522 e UENF 312522), *Pseudomonas monteilli* UENF 311212, *Azospirillum* sp. UENF 311223, *Azospirillum brasilense* (UENF 312201 e UENF 312221) e *Herbaspirillum seropedicae* UENF 314221. A inoculação ocorreu na região ao redor do colo das plântulas, que foram avaliadas após 28 dias. O ensaio, com três repetições, foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos (8 bactérias isoladas de mamão e controle, que constou de plantas não inoculadas).

2.3 Contagem de bactérias

A contagem das bactérias diazotróficas presentes no tecido radicular foi realizada para os ensaios de avaliação da promoção do crescimento vegetal em abacaxi e mamão de acordo com técnica do número mais provável (Dobereiner et al., 1995). Amostras de 1 g das raízes foram maceradas separadamente em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85 %). A partir desta diluição (10^{-1}), foram realizadas diluições seriadas, tomando-se 1mL da diluição original em 9 mL de solução salina até a diluição 10^{-8} . Em seguida, alíquotas de 100 μ L das diluições foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 mL do meio semi- sólido NFb e JMV, semisseletivos para isolamento de *Azospirillum* sp. e *Burkholderia* sp., respectivamente. Os fracos foram incubados a 30°C, por 7 dias. Após este período, foi avaliado o crescimento bacteriano pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady.

2.4 Promoção do crescimento em plantas de Goiabeira (*Psidium guajava*)

2.4.1 Desempenho de bactérias diazotróficas em plântulas de goiabeira *in vitro*

Sementes de goiaba (*Psidium guajava*) da variedade Paluma, obtidas de plantio comercial dos municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco-

RJ, foram desinfestadas. Após esse procedimento, foram transferidas para caixa plástica, tipo gerbox, contendo papel germitest umedecidas com água.

Posteriormente, realizou-se a inoculação de 50 μL de cada suspensão bacteriana (10^8 células. mL^{-1}) sobre cada semente, momento em que foi avaliado o efeito de cinco estirpes bacterianas originalmente isoladas de planta de goiaba, sendo uma de *Azospirillum formosense* UENF 211231 e quatro de *Azospirillum* sp. (UENF 211211, UENF 211511, UENF 212211 e UENF 211531). Em seguida, as sementes foram transferidas para câmara de germinação com temperatura entre 25-30°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. O ensaio foi montado em blocos inteiramente casualizados, com seis tratamentos (5 isolados bacterianos e controle de sementes não inoculadas) com quatro repetições de 25 sementes em cada.

Após 28 dias da inoculação, plântulas normais foram avaliadas quanto aos comprimentos da radícula, parte aérea e de planta inteira, com o auxílio de uma régua graduada, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula. Além disso, avaliou-se a taxa de germinação de sementes expressa em percentagem e o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

2.4.2 Avaliação de plantas de goiabeira após a inoculação de bactérias promotoras do crescimento em casa de vegetação

Sementes de goiaba da variedade Paluma, desinfestadas, foram semeadas em vasos plásticos de 200 ml contendo substrato Plantmax® autoclavado. Em seguida, 50 μL de suspensões bacterianas dos isolados (10^8 células. mL^{-1}) citados no ensaio anterior foram inoculadas sobre as sementes e transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram por 60 dias. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (5 estirpes de bactéria mais controle não inoculado) e com quatro repetições.

2.5 Efeito de inoculação de diferentes bactérias diazotróficas na promoção do crescimento de plantas de maracujazeiro

O ensaio foi montado utilizando bactérias isoladas das frutíferas mamão (*Azospirillum formosense* UENF 211231, UENF 311211 e UENF 411202), goiaba (*Azospirillum* sp. UENF 211531) e maracujá (*Azospirillum brasilense* UENF

411211). Os isolados selecionados para inoculação em plantas de maracujá não foram originalmente isolados da mesma planta hospedeira (inoculação homóloga) e sim baseados naqueles isolados que apresentavam múltiplos mecanismos de ação, como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, zinco e produção de AIA (Rodrigues et al., 2016, submetido).

Sementes de maracujá da cultivar Yellow master FB200 foram desinfestadas, colocadas em papel germitest umedecido com água autoclavada e transferidas para câmara de germinação à temperatura de 30°C, 16 horas na luz e 8 horas no escuro. Após germinadas, essas sementes foram postas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax® autoclavado e, em trinta dias do transplante, as plantas foram transferidas para saco plástico de 300 ml contendo substrato Plantmax® autoclavado, momento em que se inoculou 1 ml de suspensão bacteriana (10^8 células. mL⁻¹) de cada isolado. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação, sendo avaliadas 45 dias depois. O ensaio foi montado em delineamento em blocos ao acaso, seis tratamentos e quatro repetições. O controle constituiu-se de plantas não inoculadas.

2.6 Análises dos dados

Após 120, 60, 28 e 45 dias em casa de vegetação, as plantas de abacaxi, goiaba, mamoeiro e maracujá, respectivamente, foram avaliadas. As variáveis analisadas foram peso fresco e seco da parte aérea e peso fresco e seco do sistema radicular. Para avaliar a matéria seca, a parte aérea foi cortada na altura do colo da planta, seca em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas e posteriormente pesada em balança analítica. O sistema radicular foi removido cuidadosamente do substrato e lavado em água parada, depois colocado para secar em papel toalha e em seguida pesado em balança analítica. O peso seco do sistema radicular foi obtido através do procedimento descrito para a parte aérea. Os resultados referentes a contagem bacteriana e variáveis agrônomicas foram submetidos à análise de variância pelo programa SAEG (Ribeiro Junior, 2001) e as médias de tratamento comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

2.8 Ensaio para avaliação estrutural da interação bactéria-planta: colonização de *Azospirillum* em raízes de plântulas de maracujazeiro e de goiabeira oriundas de sementes

2.8.1 Material vegetal

Para avaliar a interação da bactéria-planta hospedeira, foi usada a bactéria *Azospirillum brasilense* UENF 411211, isolada de maracujá e identificada como *A. brasilense* e a bactéria *Azospirillum* sp. estirpe UENF 211531 que se destacaram na promoção de crescimento dessa planta, conforme experimentos citados acima.

Para tal, sementes de maracujá da cultivar Yellow master FB200 foram desinfestadas e colocadas para germinar como descrito anteriormente no ensaio de promoção de crescimento para maracujá. Após a germinação, foi realizada a transferência das plântulas para tubo de ensaio contendo vermiculita autoclavada três vezes consecutivas. Em seguida, foi inoculado 1ml de suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^8 células. mL⁻¹ sobre o colo das plântulas, sendo mantidas por sete dias após a inoculação em sala de cultivo sob a temperatura de 30°C (16 horas na luz e horas no escuro). O experimento foi avaliado após 24 horas (tempo 1) e após o sétimo dia da inoculação da suspensão bacteriana (tempos 2) com três repetições em cada tempo. O controle constou de plântulas não inoculadas.

Sementes de goiaba da cultivar Paluma foram desinfestadas e colocadas para germinar em placas germitest como descrito anteriormente para o ensaio de promoção do crescimento. Neste momento 100 µL de uma suspensão bacteriana da estirpe UENF 211531 foi aplicada a cada semente e decorridos 10 dias as plantas foram colhidas e processadas para microscopia óptica e eletrônica de varredura.

2.8.2 Preparo de amostras para microscopia

Para a visualização das bactérias em microscópio eletrônico de varredura, pequenos fragmentos de raízes foram seccionados (0,5 a 1,0 cm), com auxílio de estilete. Em seguida, foram fixadas de acordo com a técnica de Kitajima e Leite (1999) em uma solução de glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão fosfato 0,05 M, por duas horas. Em seguida, realizou-se três lavagens em tampão fosfato 0,05 M. Os fragmentos foram pós-fixados em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão fosfato 0,05 M, à temperatura ambiente por duas horas. Após três lavagens de uma hora no mesmo tampão, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 3 vezes 100%).

Posteriormente, amostras foram transferidas para o equipamento *Critical Point Drying Apparatus* (Mod CPD 030, Bal-Tec) e, após secagem, foram metalizadas utilizando o *Automatic Sputter Coater* SCD 050, Bal-Tec. Após esse procedimento, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 (Zeiss).

3 Resultados

3.1 Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento das mudas micropropagadas de abacaxizeiro Smooth Cayenne

Um total de dez estirpes de bactérias diazotróficas originalmente isoladas de plantas de abacaxi (Santos, 2008) foram avaliadas quanto a capacidade de estimular o crescimento de plântulas de abacaxi cultivar Smooth Cayenne oriundas do processo de micropropagação. Aumentos significativos no acúmulo de massa fresca da parte aérea foram observados para *Burkholderia silvatlantica* UENF117111, *Burkholderia* sp. UENF 111111 e *A. oryzae* UENF114511, diferindo dos demais isolados e plantas controle com aumentos superiores a 80% (Figura 1A). Para o acúmulo de matéria seca da parte aérea (Figura 1B), os dois dos três isolados citados foram significativamente superiores às plantas controle, no entanto as diferenças entre os isolados foram mais discretas.

Comparados ao controle, os efeitos sobre o sistema radicular foram ainda mais proeminentes. Para a massa fresca radicular (Figura 1C), as 3 estirpes acima citadas foram superiores ao controle, porém outros cinco isolados (UENF: 111222, 117922, 114121, 114111 e 114112) se destacaram com relação a plantas controle. Tendência similar foi observada para a massa seca radicular com um primeiro grupo de estirpes com incremento superior a 400% (UENF 117111, 111111 e 114511), um segundo grupo com incrementos na faixa de 200% (UENF 111222, 114121 e 117922) (Figura 1D).

Vale ressaltar que as médias de incremento de biomassa de plantas de abacaxi inoculadas com estirpes de *Burkholderia* spp., foram superiores àquelas obtidas com estirpes de *Azospirillum* spp., apontando o maior potencial de espécies deste gênero para a promoção do crescimento em plantas de abacaxi

oriundas de micropropagação e submetidas a uma fase de aclimatização em casa de vegetação.

Importante destacar são as respostas significativamente inferiores da estirpe UENF 118611, um diazotrófico do gênero *Azospirillum* que não produz AIA, não solubiliza Zn e P-Araxá (Rodrigues et al., 2016, submetido). Contrariamente, das bactérias diazotróficas testadas, *B. silvatlantica* UENF-117111 apresentou as respostas mais consistentes e incrementos de biomassa superiores em todas as variáveis analisadas, se caracterizando por produzir AIA com e sem triptofano e solubilizar P-Ca e Zn (Rodrigues et al., 2016, submetido).

3.2 Avaliação da inoculação de bactérias em mudas do mamoeiro

Foi avaliado o efeito de oito isolados de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de mamão e testadas em plantas de mamão do híbrido UC01 (Formosa). O efeito das bactérias sobre o crescimento de plantas de mamão foi variável em função das variáveis avaliadas (Figuras 2A, B, C e D).

Todas as estirpes testadas promoveram incrementos significativos na massa fresca da parte aérea com relação a plantas controle (Figura 2A). Os maiores incrementos foram observados para as estirpes do gênero *Azospirillum*, com maior destaque para *A. formosense* UENF 311522 e *Azospirillum* sp. UENF 311223, seguido de *A. brasilense* UENF 312221. Com incrementos intermediários e ainda significativos com relação a plantas controle estão os isolados de *Pseudomonas monteilli* UENF 311212, diferindo das demais bactérias e do controle (Figura 2A). Além dessas bactérias, *A. brasilense* UENF 312201 e *Herbaspirillum seropedicae* UENF 314221 diferiram do controle.

Quanto ao incremento da massa seca da parte aérea, seis estirpes apresentaram incrementos significativos com relação a plantas não inoculadas (Figura 2B). As estirpes de maior destaque são as mesmas destacadas na figura 4A, todas pertencentes ao gênero *Azospirillum* (UENF 311522, 311223 e 312221).

Quando as variáveis massa fresca e seca da raiz foram avaliadas observou-se que *A. brasilense* UENF 312221, *A. formosense* UENF 311522 e *Azospirillum* sp. UENF 311223 proporcionaram aumento dessas variáveis quando comparadas com o controle e com os demais tratamentos (Figura 2C e D). Entretanto, efeito contrário na inoculação de *A. formosense* UENF 312522 e

UENF 311211 foi observado quando a variável massa fresca da raiz foi analisada, em que a primeira bactéria apresentou peso inferior ao do controle (Figura 2C).

3.3 Contagem de bactéria dos ensaios de abacaxizeiro e mamoeiro

Quanto ao número de bactérias em raízes de abacaxizeiro, aumento das populações foi observado em mudas inoculadas com as bactérias do gênero *Burkholderia* UENF 117111, UENF 111111, UEN 11411 e UEN 114112 e *A. oryzae* UENF 114511. Em mudas de mamoeiro, observou-se que as maiores populações de bactérias foram observadas para os isolados *Pseudomonas monteilli* UENF 311212, *A. formosense* UENF 311522 e *A. brasilense* UENF 312221. Nesse trabalho, observou-se a presença de bactérias diazotróficas em plantas não inoculadas de abacaxi e mamão, respectivamente (Figuras 3 e 4), evidenciando que os efeitos significativos observados na estimulação do crescimento vegetal nos tratamentos inoculados com as estirpes testadas se sobrepõem aos efeitos da comunidade microbiana diazotrófica naturalmente associada a plantas controle.

3.4 Desempenho de bactérias diazotróficas em plântulas de Goiabeira *in vitro* e em casa de vegetação

Foram conduzidas avaliações sobre efeito da inoculação de 5 estirpes de bactérias diazotróficas originalmente isoladas de goiaba sobre a germinação de sementes de goiaba da variedade Paluma *in vitro* e no desenvolvimento de plantas em casa de vegetação.

Nos ensaios *in vitro*, todas as bactérias testadas na germinação de sementes da variedade Paluma contribuíram para o aumento das taxas de germinação e para o desenvolvimento das plântulas (Fig 5A). Maiores incrementos nesta característica (acima de 90% de germinação) foram atribuídos aos isolados (UENF 211211, 211511 e 212211), todos estes designados como pertencentes a *Azospirillum* sp., seguidos de um grupo contendo o isolado UENF 211231 (*Azospirillum formosense*) e UENF 211531 (*Azospirillum* sp.) com cerca de 70% de germinação, todos significativamente superiores a plantas controle com germinação inferior a 50% (Figura 5A).

Os valores de germinação foram influenciados pelos efeitos positivos da inoculação sobre o índice de velocidade de germinação - IVG (Figura 5B) na

comparação com plantas controle, uma vez que se observou um atraso de cinco dias para começar a germinar, enquanto em sementes inoculadas com dois a três dias (Figura 5B). No curso do tempo os isolados de *Azospirillum* sp. UENF 211211, UENF 211511 e UENF 212211 foram os que apresentaram melhores resultados (IVG > 0,8), diferindo dos demais. Porém, *A. formosense* UENF 21231 e *Azospirillum* sp. UENF 211531 (IVG aprox. 0,7) foram superiores ao controle (IVG < 0,45). Resultados obtidos para incremento do comprimento radicular deram destaque para o mesmo conjunto de três estirpes evidenciadas para IVG (Figura 5C), evidenciando uma correspondência entre os estímulos a germinação e o crescimento da radícula. Os isolados UENF 211231 e UENF 211531 não diferiram do controle e apresentaram valores intermediários de IVG (Figuras 5C e B).

Para as variáveis comprimento da parte aérea e comprimento total das plântulas, todas as bactérias se destacaram, apresentando comprimento superior ao controle (Figura 5D e E). Interessante destacar que os isolados que se destacaram na promoção do crescimento radicular (3 isolados), apresentaram tendência de menor estímulo da parte aérea. Sendo observada a mesma tendência para isolados que se destacaram na promoção da parte aérea, por exemplo UENF 211511. Estes efeitos compensatórios entre os estímulos de promoção do crescimento de raízes e parte aérea resultaram em incrementos significativos para todos os isolados em relação ao controle quanto ao comprimento total de plântulas de goiaba (Figura 5E).

Estes mesmos isolados foram testados em condições de casa de vegetação. Dos cinco isolados, quatro promoveram incrementos significativos na massa fresca da parte aérea com *A. formosense* UENF 211231 e *Azospirillum* sp. UENF 211511, UENF 212211 e UENF 211531 proporcionando aumento do peso de 52,63%, 55,26%, 34,21% e 78,94%, respectivamente, quando comparado com o controle (Figura 6A). Estes resultados apresentam tendências comparativas similares àqueles obtidos para condições *in vitro*.

Já para variável peso da matéria fresca das raízes, as bactérias UENF 211231 UENF 211511, UENF 212211 e UENF 211531 apresentaram um aumento de 28,95%, 13,15%, 18,42% e 57,89%, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 6B). Por sua vez, *Azospirillum* sp. UENF-211531 apresentou

os melhores resultados em comparação com as demais bactérias, para as duas variáveis, massa fresca da parte aérea e raiz analisadas (Figura 6A e B).

Resultados diferentes daqueles observados *in vitro* foram observados para *Azospirillum* sp. UENF 211211 e UENF 211511, que não apresentaram diferença em relação ao controle (Figura 6A e B), para as variáveis massa fresca da raiz e massa fresca da parte aérea, respectivamente.

3.5 Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento de plantas de maracujazeiro

Neste ensaio revelou que a inoculação das bactérias isoladas das frutíferas de goiaba, mamão e maracujá proporcionou o crescimento de mudas de maracujá, apresentando diferença estatística para maioria das variáveis analisadas, exceto para massa seca da parte aérea.

Verificou-se que todas as bactérias testadas, isoladas de goiabeira, mamoeiro e maracujazeiro, *A. formosense* UENF 211231, UENF 311211 e UENF 411202, *Azospirillum* sp. UENF 211531 e *A. brasilense* UENF-411211 apresentaram maior altura e comprimento da raiz, diferindo do controle (Tabela 2). As bactérias *A. formosense* UENF 211231, UENF 311211 e UENF 411202 e *Azospirillum* sp. UENF 211531 proporcionaram aumento de 118,18%, 109,09%, 90,90% e 118,18%, respectivamente para a matéria fresca da parte aérea, em relação ao controle (Tabela 2).

Para a variável massa fresca da raiz as bactérias UENF 211531, UENF 411202 e UENF 411211 (Tabela 2) apresentaram peso superior de 200%, 220% e 180%, respectivamente quando comparado com o controle (Tabela 2). Essas duas últimas bactérias também proporcionaram aumento de 100% do peso da massa seca da raiz (Tabela 2). Interessante ressaltar que os isolados homólogos (aqueles isolados de plantas de maracujá) apresentaram as respostas significativamente mais consistentes para as características biométricas avaliadas para plantas de maracujá.

3.6 Análises microscópicas da interação bactéria-planta

3.6.1 *A. brasilense* UENF 411211 em plântulas de maracujazeiro

A dinâmica temporal da colonização das raízes de plântulas de maracujazeiro pela bactéria UENF 411211- *A. brasilense* foi avaliada 24 horas e 7 dias após a inoculação, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 7 e 8), respectivamente.

Por meio desta análise, foi possível observar a adesão das bactérias na superfície da radícula em plantas recém-germinadas (24 horas após a inoculação)(Figura 7A). Interessante ressaltar que a radícula apresentava estruturas similares a complexos estomáticos, estes provavelmente não funcionais. A colonização da superfície das células epidérmicas que compõem a radícula nas proximidades do ostíolo e no ostíolo (Figuras 7B, 7C), aponta para a possibilidade destas aberturas naturais serem importantes portas de entrada para o estabelecimento endofítico de bactérias diazotróficas, hipótese que requer evidências mais convincentes para ser confirmada.

Na parede periclinal externa de células epidérmicas da radícula, verificou-se a adesão da bactéria em ataque polar e apolar, apresentando células isoladas e também formando agregados (Figura 7D). No caso da adesão bacteriana polar à parede periclinal externa de células epidérmicas da radícula foi observado frequentemente a dissolução aparente da parede celular vegetal, associada à ancoragem por meio de material do tipo fibrilar (Figura 7E). Notou-se, ainda com 24 horas, uma colonização frequente da bactéria na região da emergência da radícula com o tegumento da semente. Neste caso, observou-se a colonização em monocamada por ataque apolar na superfície radicular (Figuras 7H e I). Observou-se ainda ausência da colonização sobre a superfície do tegumento, na região interna de reserva da semente em germinação, e nas células da coifa (Figuras 7J, L e G).

Durante análise realizada após sete dias de inoculação de *A. brasilense* - UENF- 411211, observou-se colonização bacteriana no sistema dérmico da zona de alongamento/ diferenciação da radícula em forma de agregados ligados por material do tipo fibrilar (Figuras 8A e B). Uma menor colonização foi observada na zona de formação dos pelos radiculares (Figura 8C) e na zona pilífera constatou-se a adesão bacteriana na parede celular das células que compõem a base dos pelos radiculares (Figura 8D).

Já no complexo estomático da radícula, maior densidade bacteriana foi observada (Figura 8F). Ainda, na região de emissão de raízes laterais, agregados

bacterianos nas raízes primária, secundária e também em regiões próximas aos pontos de ruptura e emergência radicular foram evidenciados, sendo que, no ápice radicular da raiz secundária emergida, a colonização se apresentou de forma discreta (Figuras 8H e 8I). Nas análises realizadas em MEV não foi possível detectar a colonização endofítica da bactéria em seções longitudinais da raiz primária (Figuras 8J).

3.6.2 *Azospirillum* sp. UENF 211531 em plântulas de goiabeira

A colonização das raízes de plântulas de goiaba cultivar Paluma oriundas de sementes, após 10 dias de inoculação com *Azospirillum* sp. estirpe UENF 211531 em sistema axênico foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MEV) e microscopia óptica (MO).

Neste período de tempo foi possível observar a presença da bactéria inoculada em todas as regiões anatômicas no eixo da radícula. No ápice radicular a adesão ocorreu na superfície das células da coifa e principalmente em regiões do sistema dérmico onde existiam células da coifa destacadas (Figura 9A). Nesta região do ápice radicular, as bactérias permaneciam aderidas por ataque apolar a superfície das células da coifa (Figura 9B) com envolvimento evidente de estruturas similares a flagelos e fibrilas de ancoragem (Figura 9C).

Na região de emissão de raízes laterais a partir da radícula (Figura 9D), a frequência de colonização foi maior que na região do ápice da radícula. Nas proximidades da região de ruptura do sistema dérmico (Figuras 9D e E) foram observados diferentes agregados bacterianos, estes conectados entre si e a superfície da parece celular vegetal por material fibrilar (Figura 9F). Além da colonização da radícula e das regiões de emergência das raízes laterais, notou-se a colonização das células na superfície das raízes laterais recém-emitidas, as quais apresentam topografia distinta da superfície das raízes da radícula (Figura 9D, quadrado preto). Nesta região evidenciou-se a colonização da superfície das células epidérmicas da raiz lateral emergida a partir da colonização primária da radícula. O padrão de colonização das raízes laterais está principalmente associado às junções celulares, com adesão por ataque apolar das junções celulares de células da epiderme (Figuras 9G e H).

Na região do ápice radicular, a colonização superficial das células da coifa foi negligenciável (dados não mostrados).

Seções transversais de raízes laterais na região de formação de pelos radiculares observados em microscopia óptica evidenciaram agregados bacterianos associados à parede celular e à superfície dos pelos radiculares (Figuras 9la e lb). Nesta região não foram observadas bactérias colonizando o interior das raízes como endófitos (Figura 9lc). Na região de transição entre a radícula e a base do hipocótilo foram observados agregados discretos em junções celulares.

4 Discussão

As bactérias diazotróficas compreendem uma ampla gama de microorganismos procariotos, que apresentam grande diversidade morfológica, genética, fisiológica e filogenética (Moreira et al., 2010). São encontradas em diversas espécies vegetais, como leguminosas, gramíneas e também em frutíferas (Etesami et al., 2014; Kumar et al., 2012; Weber et al., 2009). Além de fixarem nitrogênio, essas bactérias também promovem o crescimento de plantas por meio de efeitos bioestimulantes, biofertilizantes e de bioproteção (Vessey, 2003).

Neste trabalho, verificou-se efeito de promoção do crescimento por meio da inoculação das bactérias diazotróficas isoladas de frutíferas sobre plântulas e plantas de abacaxizeiro, goiabeira, mamoeiro e maracujazeiro. A maioria dos resultados obtidos para promoção do crescimento vegetal foi com base em inoculação homóloga, ou seja, foram inoculadas estirpes bacterianas isoladas da mesma espécie vegetal avaliada. No caso do ensaio com maracujá, estirpes homólogas e heterólogas foram testadas, com resultados de promoção do crescimento mais consistentes para o primeiro grupo de estirpes.

Os dados obtidos mostram que bactérias do gênero *Burkholderia*, para mudas micropropagadas de abacaxi, e *Azospirillum*, para goiaba, mamão e maracujá, apresentaram efeitos mais consistentes no crescimento de plântulas e plantas de frutíferas. *Burkholderia* é um gênero bem conhecido usado na promoção do crescimento de plantas como na aplicação de bioinoculante (Luvizotto et al., 2010; Naveed et al., 2014; Castro-González et al., 2011).

Trabalho realizado por Baldotto et al. (2010 a,b), usando a mesma bactéria que foi testada nesse trabalho, *B.silvatlantica* UENF-117111, verificou maior incremento da biomassa da parte aérea e raízes de plântulas de abacaxi da

cultivar Vitória quando usada sozinha ou em combinação com ácidos húmicos. O uso das bactérias diazotróficas é uma alternativa para superar as perdas causadas no processo de aclimatização de mudas micropropagadas, uma vez que essas apresentam uma baixa adaptação no ambiente de estufa (Berilli et al., 2011). Assim, esses micro-organismos favorecem a sobrevivência das plântulas e reduzem o tempo de aclimatização (Weber et al., 2003).

Do mesmo modo, bactérias do gênero *Azospirillum* sp. contribuem com o aumento da biomassa seca da parte aérea e raízes, altura das plantas, aceleração da taxa de germinação e benefícios no sistema radicular, proporcionando o aumento na produtividade final (Bacilio et al., 2003; Baldotto et al., 2010a; Hungria, 2011; Vogel et al., 2014). Na literatura, há relatos que corroboram os resultados encontrados neste trabalho com a inoculação de diversas espécies desse gênero em sementes, plântulas e mudas. Inoculação de *Azospirillum* sp. proporcionou aumento da porcentagem de germinação em sementes de girassol (Shaukat et al., 2010) e também de semente de arroz (Hossain, 2015). Promoção de plântulas micropropagadas de banana cultivadas em sistema hidropônico foi obtida por *A. brasilense* (Mia et al., 2010). Essa espécie também apresentou efeito no crescimento de plantas de arroz (Ahmed and Mirza, 2013).

Os efeitos positivos destes micro-organismos sobre as plantas podem ocorrer por meio de vários mecanismos, tais como fixação biológica de nitrogênio, disponibilidade de nutrientes, controle biológico e produção de fitormônios. Na maioria das situações, o crescimento promovido por *Azospirillum* e *Burkholderia* ocorre pela produção de auxina e, em pequenas concentrações, de giberelina e citocinina (Hartmann and Baldani, 2006; Spaepen et al., 2007).

Desses mecanismos a síntese de AIA é considerada o principal mecanismo para *Azospirillum* sp. (Santi et al., 2013). Este apresenta efeitos sobre a divisão e diferenciação celular, estimula a germinação de sementes e tubérculos, aumenta a formação de raízes laterais e pelos radiculares com posterior desenvolvimento das raízes que vão favorecer a entrada dos nutrientes do solo (Bishnoi, 2015; Patten and Glick, 2002; Spaepen et al., 2007; Vacheron et al., 2013).

As bactérias usadas neste estudo foram caracterizadas fisiologicamente nessa tese em trabalho anterior e apresentaram diferenças na capacidade de

sintetizar AIA, solubilizar fósforo e zinco, fato que pode explicar o efeito benéfico no desenvolvimento das plantas pela maioria dos isolados testados. Entretanto, no ensaio com sementes de goiaba e mamão, as bactérias que apresentaram efeito na promoção do crescimento não sintetizaram AIA. Diante disso, sugere-se que outros mecanismos de ação, como produção de outros hormônios, podem ter proporcionado o desenvolvimento destas plantas.

Além disso, esse estudo demonstrou que bactérias *Azospirillum* sp. obtidas de outras espécies vegetais, como os isolados UENF- 211231, UENF-211531 e UENF-311202 obtidos de goiaba, mamão, respectivamente, apresentaram resultados positivos para a maioria das variáveis testadas em plantas de maracujá. Mostrando não especificidade entre os isolados e espécies de plantas da qual foram isoladas. Resultados semelhantes a este são encontrados na literatura. Em trabalho realizado por Pedraza et al. (2010), observaram que bactérias *A. brasilense* REC2 e 13-2 C, isoladas de morango e cana-de-açúcar, respectivamente inoculadas em sementes de arroz proporcionaram alto rendimento de grãos. *A. brasilense* isolada de gramínea também promoveu o crescimento *in vitro* e em casa de vegetação de tomate (Botta et al., 2013).

Foram observadas diferenças nas respostas de inoculação nesse estudo. Efeito negativo da inoculação de *Azospirillum* sp. foi identificado em ensaio com mudas micropropagadas de abacaxi em que a bactéria *Azospirillum* sp. UENF-118611 apresentou resultados inferiores ao controle quanto às variáveis massa fresca de raiz e seca de raiz e parte aérea. Do ponto de vista da construção do conhecimento científico sobre os mecanismos de promoção do crescimento de plantas por bactérias benéficas, o comportamento deste isolado merece ser avaliado.

Em experimento de goiaba, por sua vez, as bactérias que promoveram a germinação e o desenvolvimento das plântulas não foram as que apresentaram melhores resultados em casa de vegetação, apresentando respostas de inoculação diferentes em ensaio *in vitro* e em casa de vegetação. Essa diferença de respostas possivelmente ocorreu devido às condições do ambiente em que essas foram submetidas, favorecendo ou não a interação de determinadas bactérias com a planta. O efeito do ambiente na modulação das respostas a inoculação é largamente descrito e ainda pobremente compreendido,

representado uma das questões mais debatidas para a melhoria da consistência de resposta a inoculantes microbianos na agricultura. Trabalhos relatam que a inconsistência de resposta de inoculação com *Azospirillum* sp. entre diferentes experimentos pode ocorrer devido às variações em ambiente, solo ou substrato, nas plantas, nos componentes da microflora, nas técnicas de inoculação, taxa de inoculação, baixa sobrevivência de isolados inoculados, o estado fisiológico das bactérias (Bashan et al., 1995; Chotte et al., 2002; Ramos et al., 2002).

No que se refere à contagem do número mais provável (NMP) das bactérias utilizadas, nos ensaios de abacaxi e mamão, observou-se que as maiores populações foram obtidas pelas bactérias que promoveram maior crescimento dessas plantas, nos dois ensaios, mostrando a importância do estabelecimento da bactéria para o sucesso no desenvolvimento das plantas.

A presença de populações nativas de bactérias diazotróficas em plantas não inoculadas (plantas controle) foi observada nos meios semissólidos NFb e JMV, nas raízes de abacaxi e também nas sementes de mamão, evidenciando a presença de bactérias nos explantes de abacaxi e em sementes. Estes microorganismos são isolados de explantes, sementes, folhas, raízes, caules, frutos de diversas espécies de plantas (Esposito-Polesi, 2011). Embora, em níveis populacionais inferiores aos tratamentos inoculados, estas populações nativas produzem efeitos positivos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, o que valoriza ainda mais as respostas estatisticamente significativas obtidas para as diferentes estirpes testadas.

No presente estudo, a colonização radicular de plântulas de maracujá e goiaba inoculadas com *Azospirillum* e oriundas de sementes foi avaliada nos primeiros momentos de interação. Ambas as estirpes colonizaram distintas regiões anatômicas do eixo radicular colonizando principalmente as zonas de alongamento e diferenciação e os sítios de emergências de raízes laterais como descrito para outras bactérias diazotróficas associadas a plantas não ondulantes (James e Olivares, 1998). Diferenças na colonização do ápice radicular foram observadas entre maracujá e goiaba e na anatomia da superfície celular da radícula. Neste caso, para plantas de maracujá foram observadas em baixa densidade, estruturas similares a complexos estomáticos que seriam portas de entrada natural para o estabelecimento endofítico de bactérias. Estas observações são novas na literatura e merecem um estudo sistematizado para a

compreensão do papel destas estruturas. Neste estudo ficou igualmente evidenciada a importância da colonização da esfermosfera para colonização eficiente do sistema radicular, de tal sorte que a inoculação das sementes assegura populações do inoculante no entorno da região de ruptura do tegumento e emergência da radícula.

A colonização de raízes de maracujá por *A. brasilense* UENF- 411211 e de goiaba por *Azospirillum* sp. estirpe UENF 211531, associada à capacidade de promover o crescimento das respectivas plantas hospedeiras suscitam uma relação causa-efeito que merece estudos mais detalhados, utilizando mutantes comprometidos na capacidade de colonizar as raízes. A interação bem-sucedida da bactéria com a planta é essencial para os benefícios para as plantas (Ahmad et al., 2011).

A colonização radicular de *A. brasilense* em tomate, morango e também em cereais como trigo e milho é amplamente conhecida (Caiola et al., 2004; Camilios-Neto et al., 2014; Pedraza et al., 2009). A colonização de *A. brasilense* foi observada na zona de alongamento, no ápice da raiz e também nos pelos radiculares em raízes de plantas de morango (Guerrero-Molina et al., 2012). Em trabalho realizado por Pedraza et al. (2009), verificou-se que a promoção de crescimento de plantas por estas bactérias diazotróficas de vida livre está associada à colonização nas raízes e pelos radiculares.

Nesse trabalho não foi observada colonização endofítica da bactéria nas plantas de maracujá e goiaba, possivelmente pelo tempo em que esse ensaio foi avaliado. Aos sete dias (maracujá) e 10 dias (goiaba) após a inoculação não foram o suficiente para que a bactéria se estabelecesse e ainda colonizasse o interior das raízes. Além disso, ambas as estirpes foram originalmente isoladas da rizosfera de plantas de maracujá e goiaba e são classificadas como endofítica facultativa, podendo ou não colonizar o interior da planta (Bashan and Holguin, 1997). A colonização de *A. brasilense* na superfície de raízes de trigo também foi observada por Camilios-Neto et al. (2014) após três dias de inoculação.

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e revelam a necessidade de aprofundamento nessas pesquisas, haja vista que é inequívoco o potencial que essas bactérias têm de contribuir para o incremento da produção agrícola, sobretudo na fruticultura, sem mencionar a redução no uso de

fertilizantes e a diminuição dos impactos ambientais causados por eles, além da redução de custos.

5 Conclusões

- *B. silvatlântica* UENF 117111, *Burkholderia* sp. UENF-11111 e *A. oryzae* UENF-114511 promoveram o crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi;

- Bactérias *Azospirillum* sp. UENF- 211211, UENF-211511 e UENF-212211 foram as que proporcionaram maior porcentagem da germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de goiaba, enquanto as bactérias *Azospirillum* sp. UENF-211531 e UENF-311223 promoveram o crescimento de plântulas de goiaba em casa de vegetação;

- *A. brasilense* UENF-312221, *Azospirillum* sp. UENF- 311223 e *A. formosense* UENF- 311522 apresentaram maior efeito no desenvolvimento de plantas de mamão;

- Em plantas de maracujá, as bactérias *A. formosense* UENF-211231, UENF-411202 e UENF-311211 e *Azospirillum* sp. UENF-211531 promoveram o crescimento da parte aérea e UENF-411202 e *A. brasilense* 411211 promoveram o desenvolvimento do sistema radicular;

- A colonização de *A. brasilense* nas raízes de plântulas de maracujá com 24 horas foi observada na superfície da radícula recém-germinada e com sete dias na zona dérmica de alongamento/diferenciação da radícula, na zona de formação dos pelos radiculares e na região de emissão das raízes laterais;

- A colonização de *Azospirillum* sp em plântulas de goiaba ocorre em todas as regiões anatômicas do eixo radicular; no ápice radicular, região de emissão de raízes laterais e também em raízes laterais.

Tabela 01. Estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de fruteiras tropicais utilizadas para estudos de promoção do crescimento vegetal e análise estrutural da interação.

Planta Hospedeira	Estirpes	Taxonomia Bacteriana		Isolamento	
		Classe/Filo	Gênero/Espécie	Tecido da Planta	Meio semissólido
Abacaxi cv. Smooth Cayenne (<i>Ananas comosus</i>)	UENF117922	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i>	Folha/endófito	JNFb
	UENF111111	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	Rizosfera	JMV
	UENF111222	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum oryzae</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF112531	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum melinis</i>	Rizoplano	NFb
	UENF114111	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	Cauliplano	JMV
	UENF114112	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	Cauliplano	JMV
	UENF114121	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cauliplano	JMV
	UENF114511	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum oryzae</i>	Cauliplano	NFb
	UENF117111	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Folha/endófito	JMV
UENF118611	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Pseudo-cauliplano	JMVL	
Goiaba cv. Ogawa (<i>Psidium guajava</i>)	UENF211211	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	JNFb
	UENF211231	α -Proteobacteria	<i>Azospirillumformosense</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF211511	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	NFb
	UENF211531	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	NFb
	UENF212211	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizoplano	JNFb
Mamão cv. Baixinho de Santa Amália (<i>Carica papaya</i>)	UENF311211	α -Proteobacteria	<i>Azospirillumformosense</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF311212	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF311223	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	JNFb
	UENF311522	α -Proteobacteria	<i>Azospirillumformosense</i>	Rizosfera	NFb
	UENF312201	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizoplano	JNFb
	UENF312221	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizoplano	JNFb
	UENF312522	α -Proteobacteria	<i>Azospirillumformosense</i>	Rizoplano	NFb
UENF314221	β -Proteobacteria	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Cauliplano	JNFb	
Maracujá Amarelo (<i>Passiflora edulis</i>)	UENF411201	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF411202	α -Proteobacteria	<i>Azospirillumformosense</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF411203	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	JNFb
	UENF411204	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	JNFb
	UENF411211	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizosfera	JNFb
	UENF412522	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Rizoplano	NFb
	UENF414116	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cauliplano	JMV
	UENF414118	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cauliplano	JMV
UENF414521	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp.	Cauliplano	NFb	

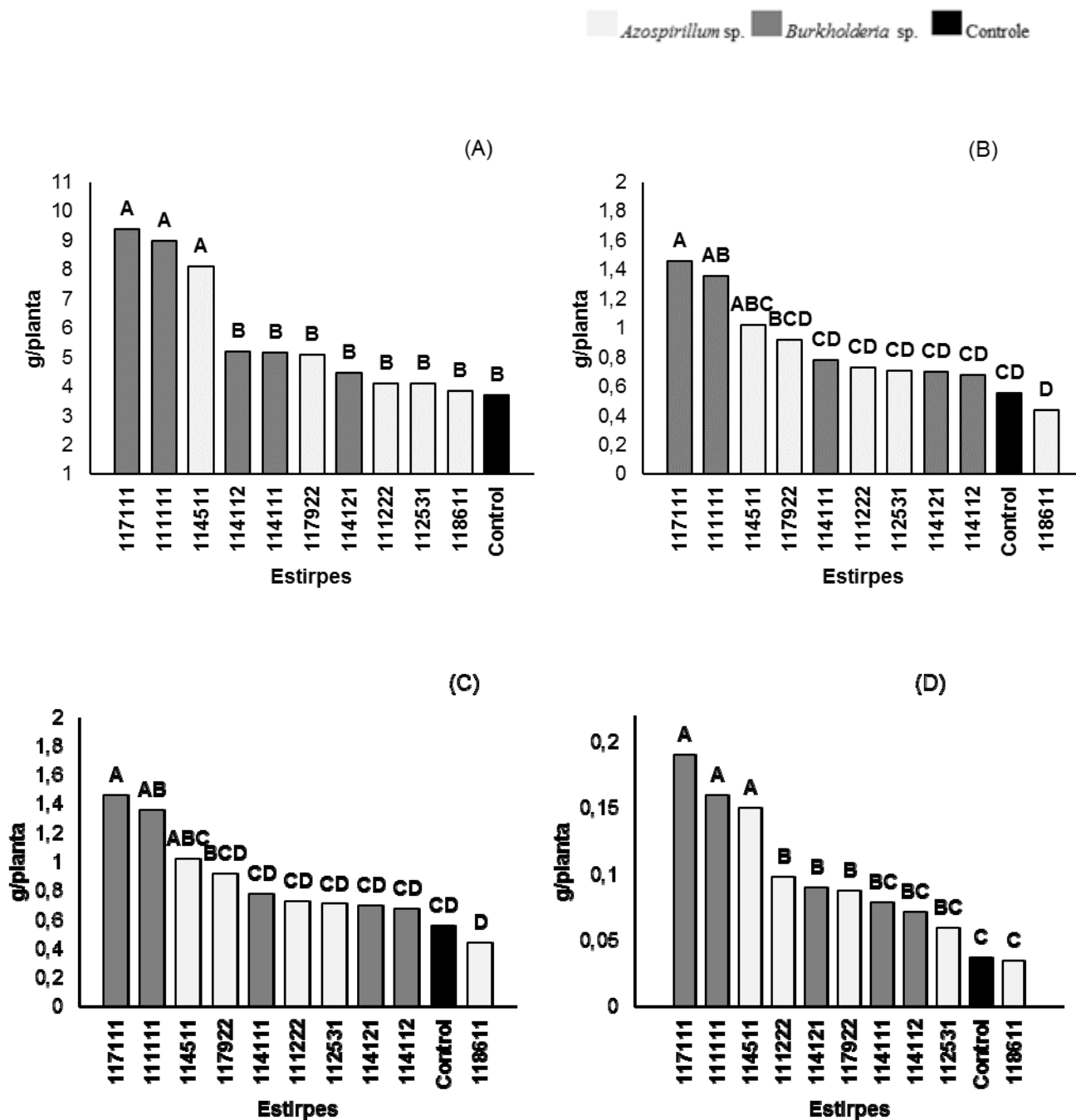


Figura 1- Efeito de bactérias diazotróficas isoladas de abacaxi sobre a massa fresca da parte aérea (A), massa seca da parte aérea (B), massa fresca da raiz (C) e massa seca da raiz de mudas (D) micropropagadas de abacaxi cultivar Smooth Cayenne, após 120 dias em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

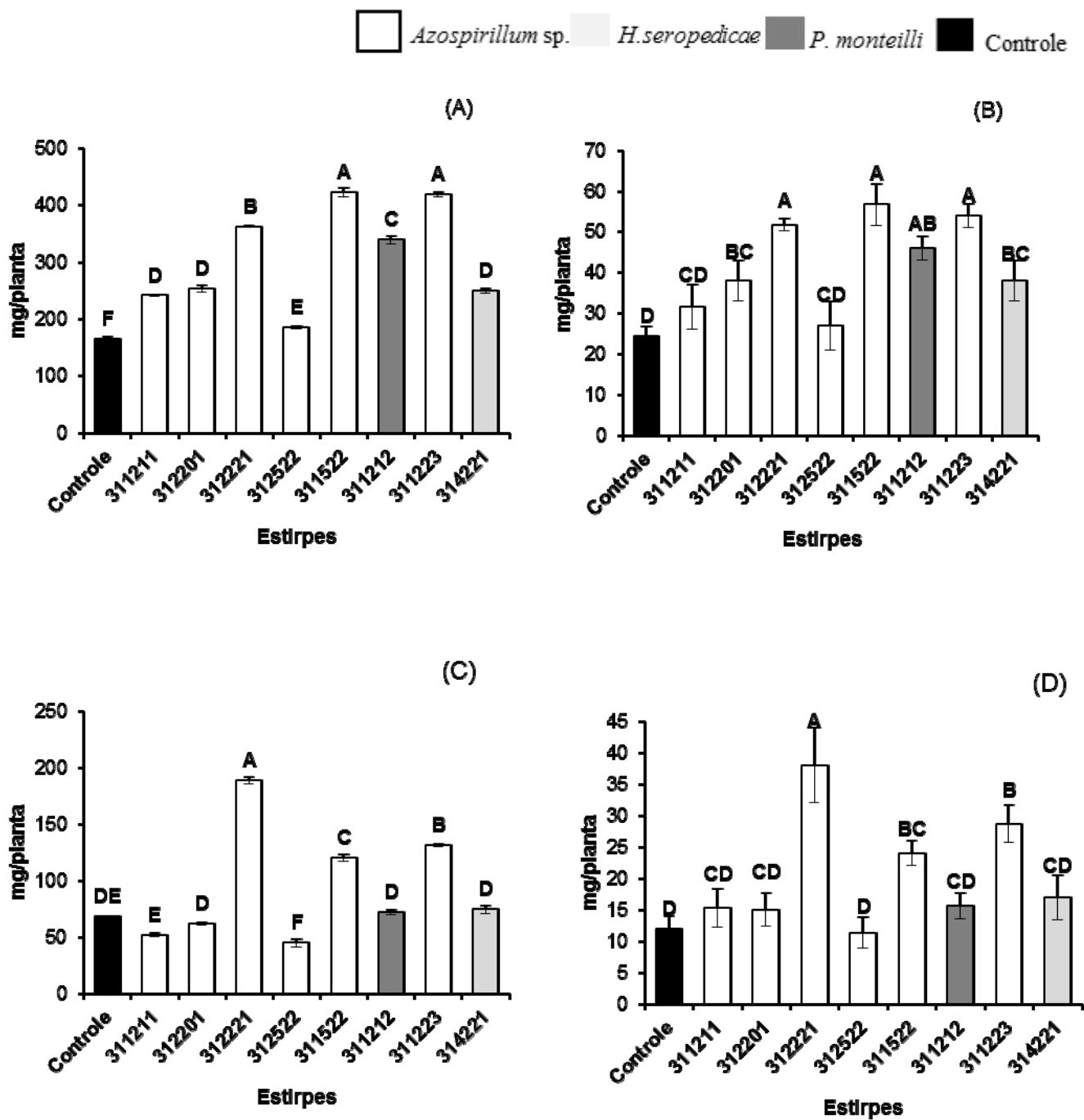


Figura 2: Efeito de inoculação de bactérias diazotróficas sobre a massa fresca da parte aérea (A), massa seca da parte aérea (B), massa fresca da raiz (C) e massa seca da raiz (D), de plantas de mamão híbrido UC01, aos 28 dias após a inoculação em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

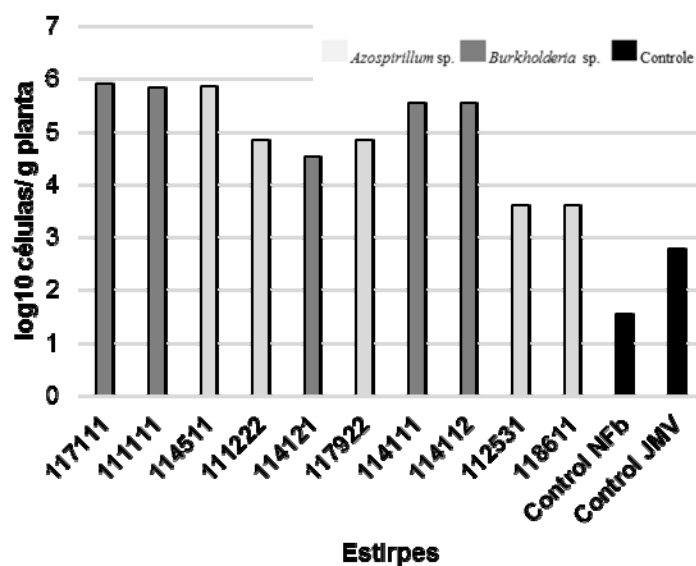


Figura 3- Log do número mais provável (NMP) de bactérias em raízes de mudas micropropagadas de abacaxi Smooth Cayenne em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas isoladas de abacaxi.

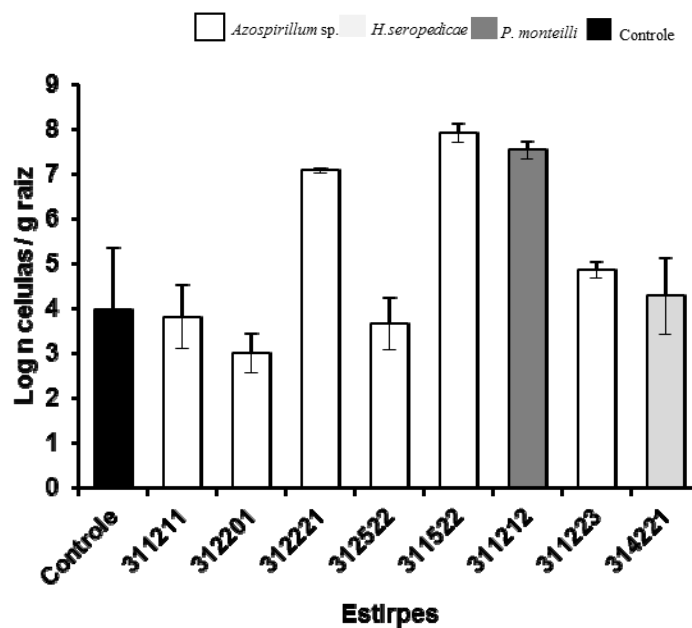


Figura 4- Log do número mais provável (NMP) de bactérias em raízes de plantas de mamão cultivar Paluma em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas isoladas de mamão.

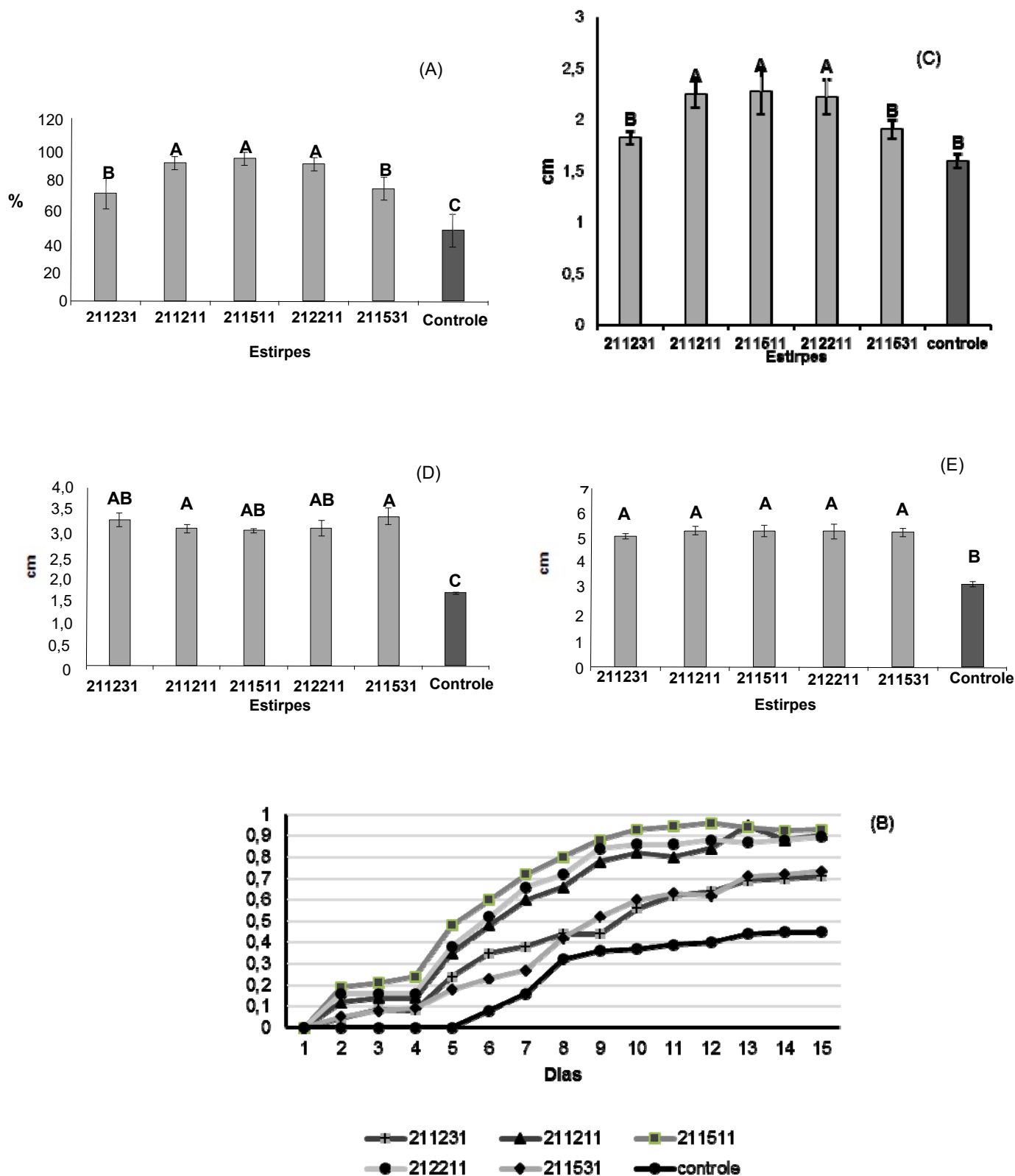


Figura 5: Efeito de inoculação de bactérias diazotróficas sobre a taxa de germinação (A), índice de velocidade de germinação (B), comprimento da radícula (D), comprimento da parte aérea (E), de plântulas de goiaba da cultivar Paluma, após 28 dias da inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

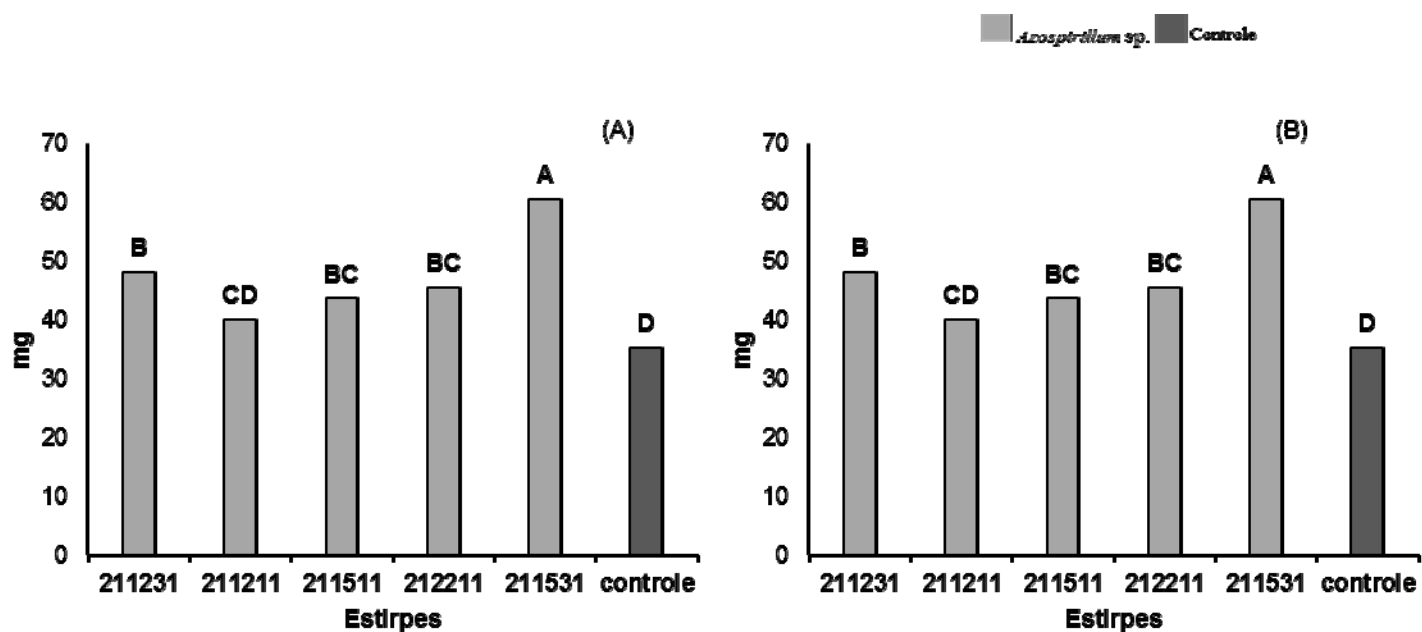


Figura 6: Efeito de inoculação de bactérias diazotróficas sobre a massa fresca da parte aérea (A) e massa fresca da raiz (B), de plantas de goiaba cultivar Paluma, após 60 dias da inoculação em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 02- Médias das variáveis altura, comprimento da raiz (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR) e massa seca da raiz (MSR) de plantas de maracujá inoculadas com diferentes bactérias obtidas de mamão, goiaba e maracujá, após 45 dias em casa de vegetação.

Isolados	Altura	CR	MFPA	MSPA	MFR	MSR
UENF 211231 <i>A. formosense</i>	12.9 a	17.0 a	2.4 a	0.6 a	0.7 b	0.1 b
UENF 211531 <i>Azospirillum</i> sp.	13.3 a	17.3 a	2.4 a	0.7 a	1.5 a	0.1 b
UENF 311211 <i>A. formosense</i>	13.6 a	17.0 a	2.3 a	0.5 a	0.5 b	0.1 b
UENF 411202 <i>Azospirillum</i> sp.	13.6 a	17.0 a	2.1 ab	0.6 a	1.6 a	0.2 a
UENF 411211 <i>A. brasilense</i>	14.0 a	17.0 a	1.6 bc	0.5 a	1.4 a	0.2 a
Controle	10.4 b	13.9 b	1.1 c	0.5a	0.5 b	0.1 b
Média	10,7	16,5	1,9	0,5	1,0	0,1
CV (%)	4,81	6,52	11,92	18,84	18,67	12,76

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

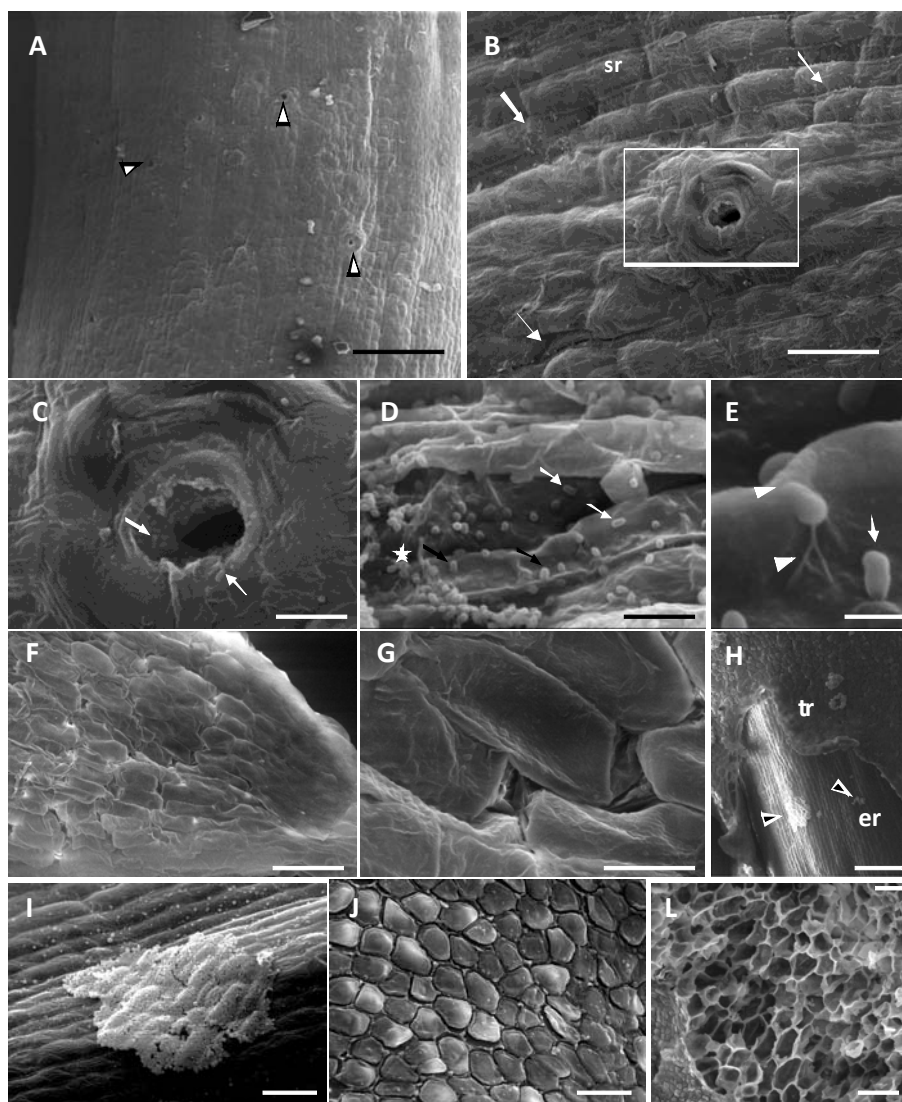


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de plântulas de maracujá (*Passiflora edulis*) após 1 dia de inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe UENF 411211 em sistema axênico. **(A)** aberturas estomáticas não funcionais (**setas**), barra = 100 µm; **(B)** abertura estomática presente na superfície da radícula (**sr**), colonização bacteriana na superfície da radícula (**setas**) e nas proximidades do ostíolo (**retângulo**), barra = 20 µm; **(C)** colonização bacteriana no ostíolo presente na radícula (**setas**), barra = 5 µm; **(D)** adesão a parede periclinal externa da radícula, bactéria em ataque polar (**seta preta**) e ataque apolar (**seta branca**) como células isoladas e formação de agregados bacterianos (**estrela**), barra = 5 µm; **(E)** adesão bacteriana a parede periclinal externa de células epidérmicas da radícula com célula em adesão polar (**seta**) e adesão por dissolução aparente da parede celular vegetal, associada a ancoragem por meio de material fibrilar (**cabeças de seta**), barra = 2 µm; **(F)** ápice radicular da radícula **recém-emergida**, barra = 50 µm; **(G)** células da coifa, barra = 10 µm; **(H)** região de emergência da radícula (**er**) associada ao rompimento do tegumento da semente (**tr**) colonização da superfície radicular (**setas pretas**), barra = 100 µm; **(I)** Colonização bacteriana em monocamada por ataque apolar na região de emergência da radícula, barra = 20 µm; **(J)** Superfície do tegumento da semente com ausência de colonização bacteriana, barra = 20 µm; **(L)** Região interna de reserva da semente em germinação com aparente ausência de colonização bacteriana, barra = 100 µm.

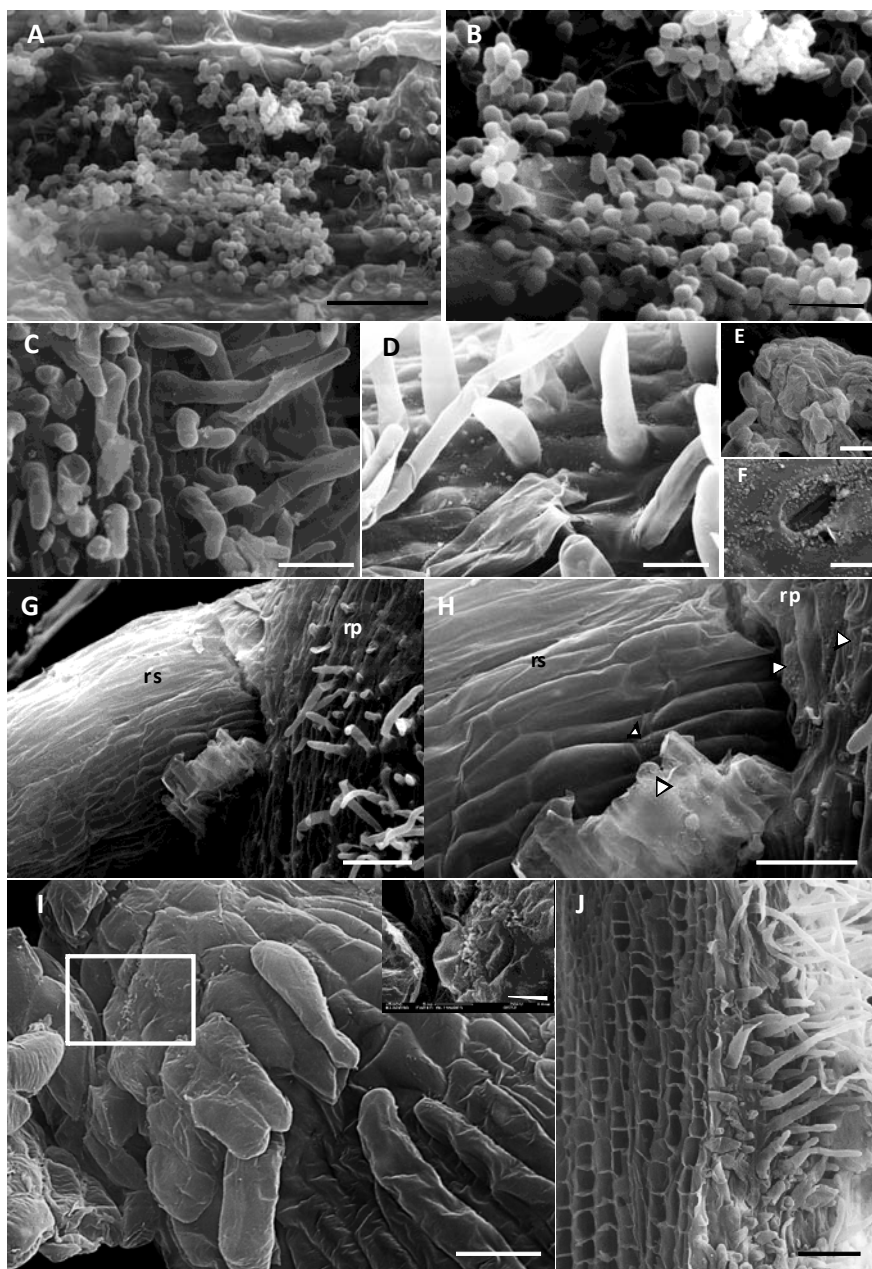


Figura 8: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de plântulas de maracujá azedo (*Passiflora edulis*) após 7 dias de inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe UENF 411211 em sistema axênico. **(A)** Colonização bacteriana na superfície zona de alongamento/diferenciação da radícula, barra = 5 μ m; **(B)** Detalhe da relação estrutural entre os agregados bacterianos evidenciados em A; **(C)** Colonização na zona de formação de pelos radiculares, barra = 50 μ m; **(D)** Detalhe da zona pilífera onde observa-se a adesão bacteriana na parede celular da base dos pelos, barra = 50 μ m; **(E)** Ápice radicular de raiz secundária não colonizado, barra = 20 μ m; **(F)** Complexo estomático rudimentar na radícula exibindo maior densidade bacteriana, barra = 10 μ m; **(G)** Visão geral da região de emergência de raízes laterais, sendo raiz primária (**rp**) e raiz secundária (**rs**), barra = 100 μ m; **(H)** Detalhe da região de emissão de raízes laterais evidenciando agregados bacterianos colonizando a raiz primária (**rp**), raiz secundária (**rs**) e regiões próximas ao ponto de ruptura e emergência radicular (**setas**), barra = 50 μ m; **(I)** Ápice radicular de uma raiz secundária emergida evidenciando colonização bacteriana discreta da superfície das células da coifa e (**retângulo**) evidenciando um microagregado, barras de 20 e 5 μ m; **(J)** Seção longitudinal da raiz primária evidenciando ausência de colonização endofítica, barra = 100 μ m.

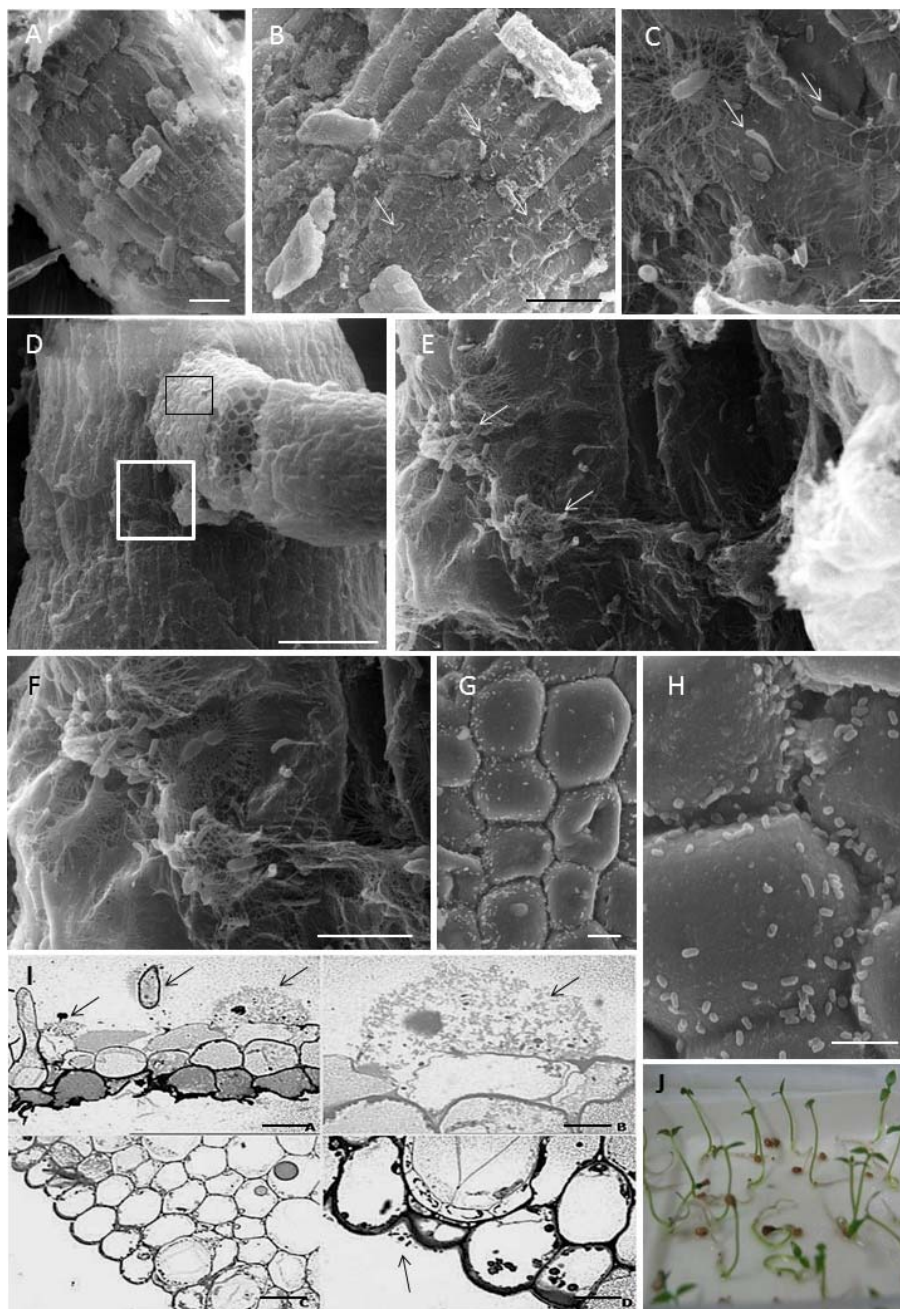


Figura 9: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), **A-H** e microscopia óptica (MO) de campo claro (**I**) de plântulas de goiaba (*Psidium guajava* cv. paluma) oriundas de sementes, após 10 dias de inoculação com *Azospirillum* sp. estirpe UENF 211531 em sistema axênico. **(A)** Visão do ápice da radícula inoculada com a bactéria evidenciando células da coifa destacadas, barra = 25 μ m; **(B)** Detalhe do ápice radicular mostrando bactérias aderidas por ataque apolar a superfície das células da coifa (**setas brancas**), barra = 20 μ m; **(C)** Visão mais detalhada de bactérias associadas ao ápice radicular com envolvimento de flagelos e fibrilas na ancoragem (**setas brancas**), barra = 2,5 μ m; **(D)** Visão geral da emissão de uma raiz lateral a partir da radícula, barra = 50 μ m; **(E)** Detalhe da área do quadrado branco em D, evidenciando agregados bacterianos na região de junção entre a radícula e a raiz lateral (**seta branca**), barra = 10 μ m; **(F)** Detalhe de E com agregados mantidos por material fibrilar, próximos a região de ruptura na junção das raízes, barra = 5 μ m; **(G)** Detalhe da área do quadrado preto em D, evidenciando a colonização da superfície das células epidérmicas da raiz lateral emergida a partir da adesão primária da radícula. Notar que a adesão é principalmente associada às junções celulares, barra = 5 μ m; **(H)** Detalhe de G evidenciando a adesão por ataque apolar das junções celulares de células da epiderme coifa e colonização bacteriana superficial não detectável, barra = 5 μ m; **(Ia)** MO de agregados bacterianos associados a parece celular e pelos radiculares do sistema dérmico na região de formação de pelos radiculares (**setas pretas**), barra = 5 μ m; **(Ib)** MO de detalhe de um agregado bacteriano aderido a parede periclinal externa da raiz lateral (**seta preta**), barra = 15 μ m; **(Ic)** Mo de seção transversal da raiz lateral evidenciando ausência de colonização endofítica, barra = 5 μ m; **(Id)** Região de transição entre a radícula e a base do hipocótilo, evidenciando agregados discretos em junções celulares, barra = 15 μ m. **(J)** Visão das plântulas de goiaba em sistema axênico.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Tarazi MF,Navarrete AA,Andreote FD,Almeida CV,Tsai SM,Almeida M. Endophytic Bacteria in Long-Term in Vitro Cultivated "Axenic" Pineapple Microplants Revealed by Pcr–Dgge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009; **26**:555-560.
- Ahmad F,Husain FM,Ahmad I (2011). Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in Pgpr Research. In "Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications" (I Ahmad Ahmad, F Pichtel, J, eds.), pp. 363-391. Springer New York, New York, NY.
- Ahmed B,Mirza MS. The Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgprs) as Biofertilizers for Cold Area Rice Variety Jp-5. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; **7**:4010-4014.
- Bacilio M,Vazquez P,Bashan Y. Alleviation of Noxious Effects of Cattle Ranch Composts on Wheat Seed Germination by Inoculation with Azospirillum Spp. *Biology & Fertility of Soils*. 2003; **38**:261-266.
- Baldotto LEB,Baldotto MA,Canellas LP,Bressan-Smith R,Olivares FL. Growth Promotion of Pineapple'vitória'by Humic Acids and Burkholderia Spp. During Acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2010a; **34**:1593-1600.
- Baldotto LEB,Baldotto MA,Olivares FL,Viana AP,Bressan-Smith R. Seleção De Bactérias Promotoras De Crescimento No Abacaxizeiro Cultivar Vitória Durante a Aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2010b; **34**:349-360.
- Bashan Y,De-Bashan LE. Chapter Two-How the Plant Growth-Promoting Bacterium Azospirillum Promotes Plant Growth—a Critical Assessment.*Advances in agronomy*. 2010; **108**:77-136.
- Bashan Y,Holguin G. Azospirillum-Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 1997; **43**:103-121.
- Bashan Y,Holguin G,De-Bashan LE. Azospirillum-Plant Relationships: Physiological, Molecular, Agricultural, and Environmental Advances (1997-2003). *Canadian journal of microbiology*. 2004; **50**:521-577.
- Bashan Y,Puente ME,Rodriguez-Mendoza MN,Holguin G,Toledo G,Ferrera-Cerrato R,Pedrin S (1995). Soil Parameters Which Affect the Survival of Azospirillum Brasilense. In "Azospirillum Vi and Related Microorganisms", pp. 441-449. Springer.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, PB., Vargas, L K., Lisboa, BB., Favreto, R., Baldani, J. I., and Passaglia, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*. 2013 **63**: 94-104.
- Berilli S,Carvalho AD,Freitas S,Farias D,Marinho CS. Avaliação Do Desenvolvimento De Diferentes Tamanhos De Mudas Micropropagadas De Abacaxizeiro, Após Aclimatação. *Bras. Frutic*. 2011; **33**:208-214.
- Bernabeu PR,Pistorio M,Torres-Tejerizo G,Estrada-De los Santos P,Galar ML,Boiardi JL,Luna MF. Colonization and Plant Growth-Promotion of Tomato by Burkholderia Tropica. *Scientia Horticulturae*. 2015; **191**:113-120.
- Bishnoi U (2015). Chapter Four - Pgpr Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. In "Advances in Botanical

- Research" (B Harsh Janine, S, eds.), Vol. Volume 75, pp. 81-113. Academic Press.
- Botta AL, Santacecilia A, Ercole C, Cacchio P, Del Gallo M. In Vitro and in Vivo Inoculation of Four Endophytic Bacteria on *Lycopersicon Esculentum*. *New biotechnology*. 2013; **30**:666-674.
- Caiola MG, Canini A, Botta A, Del Gallo M. Localization of *Azospirillum Brasilense* Cd in Inoculated Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) Roots. *Annals of microbiology*. 2004; **54**:365-380.
- Camilios-Neto D, Bonato P, Wassem R, Tadra-Sfeir MZ, Brusamarello-Santos LC, Valdameri G, Donatti L, Faoro H, Weiss VA, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM. Dual Rna-Seq Transcriptional Analysis of Wheat Roots Colonized by *Azospirillum Brasilense* Reveals up-Regulation of Nutrient Acquisition and Cell Cycle Genes. *BMC Genomics*. 2014; **15**:1-13.
- Castanheira N, Dourado AC, Kruz S, Alves PI, Delgado-Rodriguez AI, Pais I, Semedo J, Scotti-Campos P, Sanchez C, Borges N, Carvalho G, Barreto Crespo MT, Fareleira P. Plant Growth-Promoting Burkholderia Species Isolated from Annual Ryegrass in Portuguese Soils. *J Appl Microbiol*. 2016; **120**:724-39.
- Castro-González R, Martínez-Aguilar L, Ramírez-Trujillo A, Estrada-de los Santos P, Caballero-Mellado J. High Diversity of Culturable Burkholderia Species Associated with Sugarcane. *Plant and Soil*. 2011; **345**:155-169.
- Chamam A, Sanguin H, Bellvert F, Meiffren G, Comte G, Wisniewski-Dyé F, Bertrand C, Prigent-Combaret C. Plant Secondary Metabolite Profiling Evidences Strain-Dependent Effect in the *Azospirillum–Oryza Sativa* Association. *Phytochemistry*. 2013; **87**:65-77.
- Chotte J-L, Schwartzmann A, Bally R, Monrozier LJ. Changes in Bacterial Communities and *Azospirillum* Diversity in Soil Fractions of a Tropical Soil under 3 or 19 years of Natural Fallow. *Soil Biology and Biochemistry*. 2002; **34**:1083-1092.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant Growth-Promoting Bacteria in the Rhizo- and Endosphere of Plants: Their Role, Colonization, Mechanisms Involved and Prospects for Utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010; **42**:669-678.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y. Responses of Agronomically Important Crops to Inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*. 2001; **28**:871-879.
- Döbereiner, J.; Baldani, VLD, Baldani, JI. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas. Seropédica, Embrapa Agrobiologia. 1995. 66p.
- Esposito-Polesi NP. Microrganismos Endofíticos E a Cultura De Tecidos Vegetais: Quebrando Paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*. 2011; **9**:533.
- Etesami H, Mirsyed Hosseini H, Alikhani H. In Planta Selection of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria for Rice (*Oryza Sativa* L.). *Journal of soil science and plant nutrition*. 2014; **14**:491-503.
- Guerrero-Molina MF, Winik BC, Pedraza RO. More Than Rhizosphere Colonization of Strawberry Plants by *Azospirillum Brasilense*. *Applied soil ecology*. 2012; **61**:205-212.
- Guimarães SL, Baldani VLD, Jacob-Neto J. Viability of Peat Inoculum Produced with Associative Bacteria and Molybdenum. *Revista Ciência Agronômica*. 2013; **44**:10-15.

- Hartmann A, Baldani J (2006). The Genus *Azospirillum*. In "The Prokaryotes" (M Dworkin Falkow, S Rosenberg, E Schleifer, K-H Stackebrandt, E, eds.), pp. 115-140. Springer New York.
- Hossain MM. Effects of *Azospirillum* Isolates Isolated from Paddy Fields on the Growth of Rice Plants. *Research in Biotechnology*. 2015; **6**:15-22.
- Hungria M (2011). "Inoculação Com *Azospirillum* Brasilense: Inovação Em Rendimento a Baixo Custo," Embrapa Soja.
- James, EK, Olivares, FL. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1998; **17**:77-119.
- Kang SM, Khan AL, Hussain J, Ali L, Kamran M, Waqas M, Lee IJ. Rhizonin a from *Burkholderia* Sp. Kctc11096 and Its Growth Promoting Role in Lettuce Seed Germination. *Molecules*. 2012; **17**:7980-8.
- Kitajima, EW, Leite, B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. Apostila de apoio. Piracicaba. Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, ESALQ/USP, 1999. 46 p.
- Kochoni E, Didagbé YO, Adjanohoun A, Allagbé M, Sikirou R, Gachomo EW, Kotchoni SO, Baba-Moussa L. Effect of Different Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Maize Seed Germination and Seedling Development *American Journal of Plant Sciences*, 2013; **4**: 1013-1021 .
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. *Bacillus* Strains Isolated from Rhizosphere Showed Plant Growth Promoting and Antagonistic Activity against Phytopathogens. *Microbiological Research*. 2012; **167**:493-499.
- Luvizotto DM, Marcon J, Andreote FD, Dini-Andreote F, Neves AA, Araújo WL, Pizzirani-Kleiner AA. Genetic Diversity and Plant-Growth Related Features of *Burkholderia* Spp. From Sugarcane Roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; **26**:1829-1836.
- Magalhaes Cruz L, de Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Dobereiner J, Pedrosa Fde O. 16s Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* Spp.) and Pineapple (*Ananas Comosus* (L.) Merrill). *Applied & Environmental Microbiology*. 2001; **67**:2375-9.
- Maguire, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 1962; **2**: 176-177.
- Masciarelli O, Urbani L, Reinoso H, Luna V. Alternative Mechanism for the Evaluation of Indole-3-Acetic Acid (Iaa) Production by *Azospirillum* Brasilense Strains and Its Effects on the Germination and Growth of Maize Seedlings. *Journal Microbiology*. 2013; **51**:590-597.
- McCrary MH. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. *The Journal of Infectious Diseases*. 1915; 183-212.
- Mehnaz S (2015). *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In "Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets", pp. 297-314. Springer.
- Melnick RL, Zidack NK, Bailey BA, Maximova SN, Guiltinan M, Backman PA. Bacterial Endophytes: *Bacillus* Spp. From Annual Crops as Potential Biological Control Agents of Black Pod Rot of Cacao. *Biological Control*. 2008; **46**:46-56.
- Menaka M. Comparative Effectiveness of Different Isolates of *Azospirillum* on Nitrogen Fixation and Yield and Yield Attributing Characters of Tomato in Chhattisgarh. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; **7**:3615-3620.

- Mia M, Baset A, Shamsuddin Z, Mahmood M. Use of Plant Growth Promoting Bacteria in Banana: A New Insight for Sustainable Banana Production. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2010; **12**:459-467.
- Moreira FM, S, Da Silva K, Nóbrega RSA, De Carvalho F. Bactérias Diazotróficas Associativas: Diversidade, Ecologia E Potencial De Aplicações. *Comunicata Scientiae*. 2010; **1**:74.
- Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; **15**:473-497.
- Naveed M, Mubeen S, Khan S, Ahmed I, Khalid N, Suleria HAR, Bano A, Mumtaz AS. Identification and Characterization of Rhizospheric Microbial Diversity by 16s Ribosomal Rna Gene Sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014; **45**:985-993.
- Patten CL, Glick BR. Role of Pseudomonas Putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied & Environmental Microbiology*. 2002; **68**:3795-3801.
- Pedraza RO, Bellone CH, de Bellone SC, Sorte PMFB, dos Santos Teixeira KR. Azospirillum Inoculation and Nitrogen Fertilization Effect on Grain Yield and on the Diversity of Endophytic Bacteria in the Phyllosphere of Rice Rainfed Crop. *European Journal of Soil Biology*. 2009; **45**:36-43.
- Pedraza RO, Motok J, Tortora ML, Salazar SM, Díaz-Ricci JC. Natural Occurrence of Azospirillum Brasilense in Strawberry Plants. *Plant and Soil*. 2007; **295**:169-178.
- Piccolo S, Ferraro V, Alfonzo A, Settanni L, Ercolini D, Burruano S, Moschetti G. Presence of Endophytic Bacteria in Vitis Vinifera Leaves as Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Annals of Microbiology*. 2010; **60**:161-167.
- Ramos HJ, Roncato-Maccari LD, Souza EM, Soares-Ramos JR, Hungria M, Pedrosa FO. Monitoring Azospirillum-Wheat Interactions Using the Gfp and Gusa Genes Constitutively Expressed from a New Broad-Host Range Vector. *Journal of Biotechnology*. 2002; **97**:243-252.
- Ribeiro Júnior J (2001). Análises estatísticas no SAEG Viçosa:UFV301
- Rodrigues Neto J, Malavolta Jr V, Victor O. Meio Simples Para O Isolamento E Cultivo De Xanthomonas Campestris Pv. Citri Tipo B. *Summa Phytopathol*. 1986; **12**:32.
- Rodrigues PSL, Santos, S.T., Silva, N.D., Araújo, J.L.S., Reis Júnior, F.B., Baldani, J.I., Olivares, F.L (2016). Molecular and Physiological Characterization of Plant Growth-Promoting Bacteria Associated to Tropical Fruit Crops. (submetido).
- Santi, C, Bogusy, D, Franche, C.(2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Disponível em:
<http://aob.oxfordjournals.org/content/early/2013/03/08/aob.mct048.full>.
 Acesso em 02 de fevereiro de 2016.
- Santos, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. 105p. (Tese de Doutorado).
- Schroth KJW. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth under Gnotobiotic Conditions. *Phytopathol*. 1981; **71**:642-644.
- Shaukat K, Afrasayab S, Hasnain S. Growth Responses of Helianthus Annus to Plant Growth Promoting Rhizobacteria Used as a Biofertilizers. *International Journal of Agricultural Research*. 2010; **5**:1048-1056.

- Souza SA, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AM, Pereira MC, Nietsche S. Endophytic Bacterial Diversity in Banana 'Prata Ana' (Musa Spp.) Roots. *Genetics & Molecular Biology*. 2013; **36**:252-64.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-Acetic Acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; **31**:425-48.
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. Bacterial Seed Endophytes: Genera, Vertical Transmission and Interaction with Plants. *Environmental Microbiology Reports*. 2015; **7**:40-50.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Root System Functioning. *Frontiers in plant science*. 2013; **4**:
- Vessey JK. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant and Soil*. 2003; **255**:571-586.
- Vogel G, Martinkoski L, Ruzicki M. Efeitos Da Utilização De Azospirillum Brasilense Em Poáceas Forrageiras: Importâncias E Resultados. *Agropecuária Científica no Semiárido*. 2014; **10**:01-06.
- Weber OB, Correia D, Silveira MRSd, Crisóstomo LA, Oliveira EMd, Sá EG. Effect of Diazotrophic Bacteria on Pineapple Cayenne Champac Plantlets with Different Substrates. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2003; **38**:689-696.
- Weber OB, Cruz LM, Baldani JI, Döbereiner J. Herbaspirillum-Like Bacteria in Banana Plants. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001; **32**:201-205.
- Weber OB, Lima RN, Crisóstomo LA, Freitas JAD, Carvalho ACPP, Maia AHN. Effect of Diazotrophic Bacterium Inoculation and Organic Fertilization on Yield of Champaka Pineapple Intercropped with Irrigated Sapota. *Plant and Soil*. 2009; **327**:355-3

4. CONCLUSÕES

-Foram identificados quatro gêneros de bactérias: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*;

- A análise dos perfis proteicos (SDS-PAGE) e o teste de fontes de carbono revelaram que essas técnicas podem ser usadas para identificação em nível de gênero;

-Todas as bactérias formaram película em meio semissólido e reduziram acetileno;

- Apenas a bactéria *P. monteilli* UENF-311212 não amplificou o gene *nifH*;

- Vinte e quatro isolados solubilizaram fósforo em meio sólido, quando utilizada fonte de fosfato de cálcio, e 15 solubilizaram fósforo quando utilizada rocha fosfatada de araxá. Em meio líquido, a maioria dos isolados solubilizou P solúvel;

- Nove bactérias sintetizaram AIA e sete isolados solubilizaram zinco;

- Em ensaio de casa de vegetação, *B. silvatlântica* UENF-117111, *Burkholderia* sp. UENF-11111 e *A.oryzae* UENF-114511 promoveram o crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi;

-Bactérias *Azospirillum* sp. UENF-211211, UENF-211511 e UENF-212211 foram as que proporcionaram maior porcentagem da germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de goiaba. As bactérias *Azospirillum* sp. UENF-211531 e UENF-311223 promoveram o crescimento de plântulas de goiaba em casa de vegetação;

- *A. brasilense* UENF-312221, *Azospirillum* sp. UENF-311223 e *A. formosense* UENF-311522 apresentaram maior efeito no desenvolvimento de plantas de mamão;

-A colonização de *A. brasilense* nas raízes de plântulas de maracujá com 24 horas foi observada na superfície da radícula recém-germinada e com sete dias na zona dérmica de alongamento/diferenciação da radícula, na zona de formação dos pelos radiculares e na região de emissão das raízes laterais;

- A colonização de *Azospirillum* sp em plântulas de goiaba ocorre em todas as regiões anatômicas do eixo radicular; no ápice radicular, região de emissão de raízes laterais e também em raízes laterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, D. R. D.; Santos, C. C. F. (2001) Importância econômica e mercado. In: Bruckner, C. H.; Piçanha, M. C. (Ed.). *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 9-32
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*, 163: 173-181.
- Ahemad, M., and Kibret, M. (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26: 1-20.
- Amaesan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., Thajuddin, N. (2012) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 62: 805-810.
- Amorim, E.P.R., Melo, I.S. (2002) Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 565-568.
- Andrews, J.H and Harris, R.F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 145-180.

- Araújo, A.E.S., Rossetto, C.A.V., Baldani, V. L.D., Baldani, J.I. (2010) Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. *Ciência e Agrotecnologia*, 34:932-939.
- Araújo, E.O., Martins, M.R., Mercante, F.M., Vitorino, A.C.T., Urquiaga, S.S. (2014) *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and nitrogen fertilization on nitrogen use efficiency of different corn genotypes. *African Journal of Agricultural Research*, 9:3025-3031.
- Araújo, S. C. (1997) Inoculação de leguminosas. Aumento da produtividade com a fixação biológica do nitrogênio. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 3:8-10.
- Ashraf, M. A., Rasool, M., and Mirza, M. S. (2011) Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advanced Biomedical Research*, 5: 348-355.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismael, M.R., Anamul Hoque, Md., Islam, M.Z., Shahidullah, S.M., Meon, S. (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8:1247-1252
- Azevedo, J. L. Microrganismos endofíticos. (1998) Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismo_sendofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf. Acesso em 10 de março de 2015.
- Bal, H., Nayak, L., Das, S., and Adhya, T. (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*, 366: 93-105.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., and Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36: 86-93.
- Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., and Döbereiner, J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

- comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 802-10.
- Baldani, V., Baldani, J. I., Olivares, F., and Dobereiner, J.(1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65- 73.
- Baldotto, L. E. B., Baldotto, M. A., Olivares, F. L., Viana, A. P., and Bressan-Smith, R.(2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34: 349-360.
- Bashan, Y.(1991) Airborne transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *Microbial Ecology*, 22: 257-269.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S., Hernandez, J-P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378:1-33.
- Bashan, Y., Holguin, G., and de-Bashan, L. E.(2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol*, 50: 521-577.
- Bashan, Y., and Levanony, H.(1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36: 591-608.
- Bashan, Y., Puente, M.E., DE-Bashan, L.E., Hernandez, J.P. (2008) Environmental uses of of plant growth-promoting bacteria. Disponível em: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/pgpbbook.pdf>. Acesso em 13 de janeiro de 2016.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., and Baraldi, R.(1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24: 7-11.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Baldani, J. I., and Passaglia, L. M. P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63: 94-104.
- Benfica. A.F., Oliveira, A.M.G., Cardoso. C.E.L., Junghans, D.T., Reinhardt, D.F.,Cunha,G.A.P.,J esus,G.S., Oliveira, J.L., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S.,

- Sanches, N.F. Sistema de Produção de Abacaxi para o Extremo da Bahia. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/SistemaProducaoAbacaxiExtremoSulBahia/>. Acesso em 10 de março de 2015.
- Bent, E.; Chanway, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria.(1998) *Canadian Journal of Microbiology*, 44:980-988.
- Bernabeu, P. R., Pistorio, M., Torres-Tejerizo, G., Estrada-De los Santos, P., Galar, M. L., Boiardi, J. L., and Luna, M. F.(2015) Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191: 113-120.
- Bodey, G.P, Bolivar, R, Fainstein, V., Jadeja, L.(1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews Infectious Diseases*, 2:279-313.
- Bouizgarne, B. (2013) Bacteria for plant growth promotion and disease management. Disponível em:
http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642336386-c1.pdf?SGWID=0-0-45-1367910-p174671644. Acesso em 10 de janeiro de 2014.
- Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974. 217p.
- Burkholder, W. H.(1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, 40: 115-117.
- Busse, H., Denner, E. B. M., e Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. *Journal of Biotechnology*, 47: 3-38.
- Canellas, L.P; Balmori,D,M; Médici, L.O; Aguiar,N.O; Campostrini,E; Rosa, R.C.C; Façanha, A.R; Olivares, F.O. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 366:119–132
- Canellas, L.P; Olivares, F.L; Okorokova-Façanha, A.L; Façanha, A.R.(2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130:1951-1957.

- Carvalho, J.M., Miranda, D.L (2008) . As exportações brasileiras de frutas: Um panorama atual. Disponível em: <http://sober.org.br/palestra/13/1300.pdf>. Acesso em 10 de março de 2013.
- Carvalho, N.L., Zabot,V. (2012) Nitrogênio: Nutriente ou poluente. Disponível em: <http://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/4671/2990>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2016.
- Chen, W. M., de Faria, S. M., Chou, J. H., James, E. K., Elliott, G. N., Sprent, J. I., Bontemps, C., Young, J. P., and Vandamme, P.(2008) *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 58: 2174-2179.
- Chen, W. M., de Faria, S. M., James, E. K., Elliott, G. N., Lin, K. Y., Chou, J. H., Sheu, S. Y., Cnockaert, M., Sprent, J. I., and Vandamme, P.(2007) *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1055-1059.
- Chun-Yang, W.,Lin,Y., Luo, L-J., Xing, Y-Xiu., Hu, C.H., Yang, L,T., Li, Y-R, Qialin, An.(2014) Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX 120E promotes sugarcane growth. *Biology and Fertility of Soils*, 50:657-666.
- Clarridge III, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 840–862.
- Coenye, T., and Vandamme, P.(2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5: 719-29.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669–678.
- Conceição, P.M; Vieira, H.D; Canellas, L.P; Fábio Lopes Olivares, F.O; Priscila Soraia da Conceição, P.S.C. (2009) Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. Conceição et al. *Ciência Rural*, 39:1880-1883.
- Cruz, L. M., Souza, E. M., Weber, O. B., Baldani, J. I., Döbereiner, J., Pedrosa, F.O. (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing

- Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2375-2379.
- Cuong, N. D., Nicolaisen, M. H., Sørensen, J., and Olsson, S.(2011) Hyphae-Colonizing Burkholderia sp.—A New Source of Biological Control Agents Against Sheath Blight Disease (*Rhizoctonia solani* AG1-IA) in Rice. *Microbial Ecology*, 62: 425-434.
- Dharni,S., Srivastava, A.k.,Samad, A., Patra, D. (2014) Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. bourbon) grown on tannery sludge amended soil. *Chemosphere*, 117: 433–439.
- D'Eeckenbrugge, C G.; Leal, F.(2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D. P.; Paull, R. E.; Rohrbach, K. G. (Ed.). *The pineapple: botany, production and uses*. New York: CAB International. p. 13-32.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009) Plant rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment*, 32: 1682-1694.
- Döbereiner, J. (1953.) *Azotobacter em solos ácidos*. Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas, Rio de Janeiro. p. 1-36
- Döbereiner, J. (1990) Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40141990000100011. Acesso em 15 de janeiro de 2016.
- Dobereiner, J., Marriel, I. E., and Nery, M.(1976) Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal Microbiology*, 22: 1464-73.
- Dobritsa, A. P., Reddy, M., and Samadpour, M.(2010) Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1418-1426.
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., Oliveira, D. M., Urquiaga, S., and Baldani, J. I.(2012) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and

- Burkholderia strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, 369: 115-129.
- Fachinello, J. C., Pasa, M. d. S., Schmitz, J. D., and Betemps, D. L. (2011) Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 109-120.
- Fernandes, M.F., Fernandes, R.M., Rodrigues, L.S. (2001) Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 1509-1517.
- Fernandes, T.P., Nietsche, S., Costa, M.R., Xavier, A.A., Pereira, D.F.G.S., Pereira, M.C.T. (2013) Potential use of endophytic bacteria to promote the plant growth of micropropagated banana cultivar Prata Anã. *African Journal of Biotechnology*. 12:4915-1919.
- Ferreira, G. (2000) Propagação do maracujazeiro. Informe Agropecuário: Disponível em:file:///C:/Users/Rafa/Downloads/ia_206.pdf Acesso em 15 de janeiro de 2016.
- Figueiredo, J.E.F., Eliane Aparecida Gomes, E.A., Claudia Teixeira Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Marta Aparecida Teixeira, M.A., Guilherme Vitor Corrêa Lima, G.V.C., Wellington Bressan, W. (2009) Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:522-534.
- Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., Araujo, F.F., Mariano, R.L.R (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari, D.K. *Plant growth and Health Promoting Bacteria Microbiology Monographs*. 18.ed. Germany: SpringerVerlag Berlin Heidelberg, p: 21–43.
- Frache, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321: 35-59.
- Freire, J.R.J., Verneti, F, J. (1997) A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 5: 117-126.

- Gaiero, J.R., Crystal A. McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Anna S. Best, A. S., Dunfield, K.E. (2013) Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100:1738-1750.
- George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., Thomas, G.V. (2013) Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World Journal Microbiology Biotechnology*, 29:109-117.
- Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., and Fernandez, M. P. (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 274-289.
- Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal Microbiology*, 41:109–117.
- Glick, B. R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Application: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>. Acesso em 20 de janeiro de 2015.
- Glick, B. R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30-39.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., Li, J. (1998) Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519397905324>. Acesso em 10 de novembro de 2016.
- Gonzaga, L.N., Soares, J.M. (1995) A cultura da goiaba. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/114146/1/00013530.pdf>. Acesso em 13 de janeiro de 2016.
- Gopalakrishnan, S., Upadhyaya, H., Vadlamudi, S., Humayun, P., Vidya, M.S., Alekhya, G., Singh, A., Vijayabharathi, R., Bhimineni R.K., Seema, M., Rathore, A., Hahm, M.S., Sumayo, M., Hwang, Y.J., Jeon, S.A., Park, S.J., Lee, J.Y., Ahn, J.H., Kim, B.S., Ryu, C.M., Ghim, S.Y. (2012) Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions. *Journal Microbiology*, 50:380-385.

- Grant, C.(2010) Effects of nitrogen and phosphorus fertilizers on the environment. Disponível em:
[https://www.ipni.net/ppiweb/BRAZIL.NSF/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/5dabcfb5dec4ed0e832577720050ce6c/\\$FILE/Sum%C3%A1rio%20v%201.pdf](https://www.ipni.net/ppiweb/BRAZIL.NSF/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/5dabcfb5dec4ed0e832577720050ce6c/$FILE/Sum%C3%A1rio%20v%201.pdf). Acesso em 15 de janeiro de 2016.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., and Venkateswarlu, B.(2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1231-1240.
- Gupta, A.,V. Rai,V., Bagdwal,N., Goel, R. (2005) In situ characterization of mercury resistant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Microbiological Research*, 160: 385–388.
- Grayston SJ, Wang SQ, Campbell CD, Edwards AC. (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology e Biochemistry*, 30:369–78
- Hayat, R., S. Ali,S., Amara, R. Khalid,R., Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review *Annual Review of Microbiology*, 60: 579–598.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M., and Ouhdouch, Y.(2008) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2565-2575.
- Hartmann, A., Baldani, J. (2006) The Genus *Azospirillum*. In Dworkin Falkow, M., Rosenberg,S., Schleifer,E., Stackebrandt,K-H "*The Prokaryotes*". 4 ed,New York: Springer New York, p. 115-140.
- Herman, M.A.B., Nault, B.A, Smart, C.D. (2008) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*, 27:996-1002.
- Huang, J., Sheng, X., He, L. (2010) Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth--promoting endophytic bacteria of two crops. *Applied Environmental Microbiology*, 6: 710-716.

- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., and Pedrosa, F. O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331: 413-425.
- Hungria, M; Silva, K. da. (2011) Manual de curadores de germoplasma - microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc333332.pdf/b03f76d5-a438-4175-8c37-14e33d73f75a>. Acesso em 15 de janeiro de 2015.
- Hussain, A e Hasnain,S. (2011) Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 27: 2645-2654.
- IBGE- Instituto Brasileiro d Geografia e Estatística.Censo agropecuário: Disponível em:<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.
- Ilyas, N., Bano, A., Iqbal, S., and Raja, N. I. (2012) Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from maize under water stress. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 71-80.
- Innis, M. A.; Myambo, K. B.; Gelfand, D.H.; Brow, M.A.D.; Innis, M. A. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington*, 85: 9436–9440.
- Im, W.T., Bae, H.S., Yokota, A., and Lee, S. T. (2004) *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 851-855.
- Islam, M. R., Sultana, T., Joe, M. M., Yim, W., Cho, J.-C., and Sa, T.(2013) Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of Basic Microbiology*, 53: 1004-1015.
- James, E.K, Olivares, F.L. (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*,17:77–119.

- James, E. K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1997) *Herbaspirillum* an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal Experimental Botany*, 48: 85-797.
- Jha, P., Kumar, A. (2009) Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. *Microbial Ecology*, 58:179-188.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., and Chun, S.-C. (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169: 83-98.
- Kang, S. Mo., Khan, A.L., Hussain, J., Ali, L., Kamran, M., Wagas, M., Lie, I.J. (2012) Rhizoin A from *Burkholderia* sp. KCTC11096 and Its Growth Promoting Role in Lettuce Seed Germination. *Molecules*, 17:7980-7988.
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, Ş. F., and İnan, S. (2006) Auxin, Gibberellin, Cytokinin and Abscisic Acid Production in Some Bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1061-1064.
- Khalifa, A.Y.Z., Alsyeeh, A.M., Mohammed, A., Saleh, A.F.A. (2016) Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1 isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 79–86.
- Khan, Z; Doty, S.L. (2009) Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and soil*, 322:197-207.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44:301-307.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J. I., Reis, V. M., and Hartmann, A. (2001) *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 157-168.
- Kloepper, J. W.; Zablotowicz, R. M.; Lifshitz, R. (1990) Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers: Disponível em: <http://www.bashanfoundation.org/kloepper/kloeppermediatedrhizo.pdf.e>. Acesso em 10 de março de 2015.

- Kochar, M., and Srivastava, S. (2012) Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 123-131.
- Kumar, V., Behl, R.K e Narula. N (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research*, 156:87-93.
- Kumar, V.,Narula, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology Fertility Soils*, 28:301-305.
- Leite, L.F.C. & Araújo, A.S. (2007) Ecologia microbiana do solo. Disponível em: http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/documentos/2007/doc_164.pdf
Acesso em 15 de janeiro de 2015.
- Lemanceau, P.; Corberand, T.; Gardan, L.; Latour, X.; Laguerre, G.; Boeufgras, J.M. & Alabouvette, C.(1995) Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1004-1012.
- Li, L., Sinkko, H., Montonen, L., Wei, G., Lindström, K., Räsänen, L.A. (2012) Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 46–68.
- Lima, A.S., Azeredo, H.M.C., Brito, E.S. (2005) Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 20:1095-1104.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.S., Senthilkumar, M., Lee, K.C., Sundaram, S. (2010) *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 60 2451-2457.
- Mariano, R.L.R., Silveira E.B., Assis, S.M.P., Gomes, A.M.A., Nascimento, A.R., Donato, V.M.T.S. (2004) Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Disponível em:

- <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34111/1/AAPCA-V1-Revisao-04.pdf>. Acesso em 16 de fevereiro de 2015.
- Marra, L. M., Oliveira-Longatti, S. M. d., Soares, C. R. F. S., Lima, J. M. d., Olivares, F. L., and Moreira, F. M. S. (2015) Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 367-375.
- Marra, L.M., Soares, C.R.F.S., Oliveira, S.M., Ferreira, P.A.A., Soares, B.L., Carvalho, R.F., Lima, J.M., Moreira, F.M.S. (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357:289-307.
- Meletti, L. M. M. (2000) Maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.) In: Meletti, L. M. M. *Propagação de frutíferas tropicais*. 1ed. Guaíba: Agropecuária Ltda. p. 186-204.
- Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H., Mahmood, M. (2010) Use of Plant Growth Promoting Bacteria in Banana: A New Insight for Sustainable Banana Production. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12: 459–467.
- Milošević, N. A., Marinković, J. B., and Tintor, B. B. (2012) Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 123:17-26.
- Miethke, M. & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 71: 413–451.
- Moreira, F. M., S, Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., and De Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1: 74.
- Muangthong, A., Youpensuk, S., Benjavan Rerkasem, B. (2015) Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*, 26: 41–51.
- Muñoz, G. y Lozano-Tovar, M. D. (2007). Antagonistas en el manejo preventivo de la pudrición radicular en maracuyá. Informe de pasantía. Centro de Investigación Nataima. Corpoica. Espinal. 137 p.
- Naveed, M., Mubeen, S., Khan, S., Ahmed, I., Khalid, N., Suleria, H.A.R., Bano, A., Mumtaz, A.S. (2014) Identification and Characterization of Rhizospheric Microbial Diversity by 16s Ribosomal Rna Gene Sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45:985-993.

- Neiverth, A., Delai, S., Garcia, D. M., Saatkamp, K., de Souza, E. M., Pedrosa, F. d. O., Guimarães, V. F., dos Santos, M. F., Vendruscolo, E. C. G., and da Costa, A. C. T. (2014) Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *European Journal of Soil Biology*, 64: 1-5.
- Nóbrega, R.S.A.; Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. & Lima, A.S. (2004) Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência dos Solos*, 28:269-279.
- Oldroyd, G. E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 252-263.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L., Reis, V. M., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21: 197-200.
- Oliveira, J.R.P.; Trindade, A.V. (2000) Propagação e formação de pomar. Disponível em:
http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2303.pdf. Acesso em 16 de janeiro de 2016.
- Panhwar, Q. A., Jusop, S., Naher, U. A., Othman, R., and Razi, M. I. (2013) Application of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria and Organic Acids on Phosphate Solubilization from Phosphate Rock in Aerobic Rice. *The Scientific World Journal*, 1:1-10.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., Sa, T. (2005) Isolation and characterization of diatrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 2: 127–133.
- Patel, P.P., Rakhashiya, P.M., Chudasama, K.S., Thaker, C.V. (2012) Isolation, Purification and Estimation of Zeatin from *Corynebacterium aurimucosum*. *European Journal of Experimental Biology*, 2 :1-8 .
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. A., Yeoh, Y. K., Webb, R. I., Lakshmanan, P., Chan, C. X., Lim, P.-E., Ragan, M. A., Schmidt, S., and Hugenholtz, P. (2014) A new species of *Burkholderia* isolated from

- sugarcane roots promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 7: 142-154.
- Pedraza, R.O., Motok, J., Tortora, M.L., Salazar, S.M., Díaz-Ricci, J.C. Natural occurrence of *Azospirillum brasiliense* in strawberry Plants. *Plant and Soil*, 295:169-178.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., and Ladha, J. K. (1995) Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, 174: 3-28.
- Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Sánchez-Matamoros, C. R., López-Baena, F.J., Ollero F.J., Rodríguez-Carvajal, M.A., Bellogín, C.R.A, Espuny, M.R. (2013). Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 164: 749–760.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-de Los Santos, P., Reis, V. M., and Caballero-Mellado, J.(2006) *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 56: 1931-7.
- Rani, A., Yogesh S. Souche, Y.S., Goel, R. (2009) Comparative assessment of in situ bioremediation potential of cadmium resistant acidophilic *Pseudomonas putida* 62BN and alkalophilic *Pseudomonas monteilli* 97AN strains on soybean. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 62–66.
- Reetha, S., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., and Mycin, T. R. (2014) Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa*. L). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 568-574.
- Reetz, E. R.; Kist, B. B.; Santos, C. E.; Carvalho, C.; Drum, M. (2014) Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 104.
- Reinhardt, D.H.; Souza, L.F. DA S.; Cabral, J.R.S. (2000) Abacaxi. Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 77p.

- Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T.(2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion Plant Biology*, 14: 435-43.
- Reis Júnior, F.B.; Mendes, I.C.; Reis, V.M. (2011). Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M.; Reis Júnior, F.B. (Eds.) *Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. 1 ed. Planaltina: Embrapa Cerrados. p. 247-281.
- Reis, V. M.; Baldani, J. I.; Urquiaga, S.(2009) Fixação Biológica de nitrogênio associativa: um futuro promissor para cana-de-açúcar e outras gramíneas. Disponível em:
[https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=pc&id=783617&biblioteca=vazio&busca=autoria:"URQUIAGA,%20S."&qFacets=autoria:"URQUIAGA,%20S."&sort=&paginacao=t&paginaAtual=2](https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=pc&id=783617&biblioteca=vazio&busca=autoria:). Acesso em 15 de janeiro de 2016.
- Reis, V. M., Estrada-de los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., Mavingui, P., Baldani, V. L., Schmid, M., Baldani, J. I., Balandreau, J., Hartmann, A., and Caballero-Mellado, J. (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 54: 2155-62.
- Reis, V.M.; Baldani, J.I.; Baldani, V.L. & Döbereiner, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3:227-247.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*, 156:989-996.
- Rodriguez, H., R. Fraga. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Journal Biotechnoloy Advances*, 17:319-339.
- Roesch, L.F.W., Quadros, P.D.Q, Camargo, F.A.O, Triplett, E.W. (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1377-1383.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. (2014). "The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria,"4.ed.New York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.1012.

- Rothballer, M., Schmid, M., Klein, I., Gattinger, A., Grundmann, S., and Hartmann, A. (2006) *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56: 1341-1348.
- Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., and Thamchaipenet, A. (2012) Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102: 463-72.
- Saharan, B.S e Nehra, V. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21:1-30.
- Santos, J. d. S., Viana, T. d. O., Jesus, C. M. d., Baldani, V. L. D., and Ferreira, J. S. (2015) Inoculation and Isolation of plant Growth-promoting Bacteria in maize grown in vitória da conquista, bahia, brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39: 78-85.
- Santos, S.T. (2008) Biogeografia de bactérias culturáveis associadas a fruteiras tropicais. Tese- Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 101p.
- Sarkar, A., Islam, T., Biswas, G.C., Alam, S., Hassain, M., Talukder, N.M. (2012) Screening for phosphate solubilizing bacteria inhabiting the rhizoplane of rice grown in acidic soil in Bangladesh. *Microbiology and Immunology*, 59: 199-213.
- Schmid, M., Baldani, J., and Hartmann, A. (2006). The Genus *Herbaspirillum*. In "The Prokaryotes" M. Dworkin, M., Falkow, S E. Rosenberg, S.E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. 4 ed. New York: Springer New York, p.141-150.
- Serrano, L. A. L., and Cattaneo, L. F. (2010) O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:657-659.
- Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S., and van Elsas, J. D. (2012) Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28: 2749-2758.
- Sharma, S., Sayyed, R., Trivedi, M., and Gobi, T. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2: 587.

- Singh, R. P., and Jha, P. N. (2015) Plant Growth Promoting Potential of ACC Deaminase Rhizospheric Bacteria Isolated from *Aerva javanica*: A Plant Adapted to Saline Environments. *International Journal Current Microbiology Applied Sciences*, 4: 142-152.
- Siqueira, J. O., Moreira, F. M., Grisi, B. M.; Hungria, M.; Araujo, R. S. (1994) Microrganismos e processo biológicos do solo: perspectiva ambiental: Disponível em:
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes//publicacao/199962/microrganismos-e-processos-biologicos-do-solo-perspectiva-ambiental>: Acesso em 15 de fevereiro de 2016.
- Smith, R.S. (1992) Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal Microbiology*, 38: 485-492.
- Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., and Arora, D. K. (2014) Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 54: 585-597.
- Souza, R. d., Ambrosini, A., and Passaglia, L. M. P. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38:401-419.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal general Microbiology*, 43:159-271.
- Stoyanova, M., Pavlina, I., Moncheva, P., and Bogatzevska, N. (2007) Biodiversity and Incidence of Burkholderia Species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21: 306-310.
- Straliootto, R., Rumjanek, N.G.(1999) Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio: Disponível em:<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB2010/27318/1/doc093.pdf> Acesso em 15 de março de 2015.
- Suarez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonca-Previato, L., James, E. K., and Venturi, V.(2012) Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. *Microbiology Ecology*, 63: 249-66.

- Sumner, M. E. (1990). Crop Responses to Azospirillum Inoculation. In Stewart, B.A "Advances in Soil Science. 1ed. New York : Springer New York, p.53-123.
- Tapia-Hernandez, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology*, 39:45-55.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R., and Döbereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 967-980.
- Tortora, M. L., Díaz-Ricci, J. C., and Pedraza, R. O. (2012) Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and soil*, 356: 279-290.
- Trolldenier, G. (1989) Plant nutritional and soil factors in relation to microbial activity in the rhizosphere, with particular emphasis on denitrification. *Journal of Plant nutrition and soil Science*, 152: 223-30.
- Valverde, A., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., and Igual, J.-M. (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1979-1983.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P., and Willems, A. (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic Applied Microbiology*, 25: 507-12.
- Velásquez, E, Rojas, M, Lorite, M.J, Riva, s R, Zurdo-Piñeiro, J.L, Heydrich, M, Bedmar, E.J (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal Basic Microbiology*, 48:118- 124.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571-586.
- Villalobos, S.L.S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A., Pena Cabrialles, J.J. (2012) *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity

- against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Microbiology Biotechnology*, 28:2615-23.
- Vitorazi, F.J.A., Lima, K.B., Freitas, M.S.M., Martins, M.A., Olivares, F.L. (2012). Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas sob diferentes doses de fósforo. *Revista Brasileira Fruticultura*, 34: 442-450.
- Vojtková, H., Kosina, M., Sedlacek, I., Harwotová, M., Molinková, V. (2015) Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. *Folia Microbiologica*, 60:411-416.
- Wani, P.A., Zaidi, A., Khan, A.A., Khan, M.S. (2005) Effect of phorate on phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Annals Plant Protection Science*, 13:139–144.
- Walpola, B.C e Yoon, M.H. (2013). Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73:275-281.
- Wang, Y., Brown, H.N., Crowley, D.E., Szaniszlo, P.J. (1993). Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrox- amine B, in axenically grown cucumber. *Plant, Cell & Environment*, 16:579-585.
- Weber, O., Baldani, V., Teixeira, K. d. S., Kirchof, G., Baldani, J., and Döbereiner, J. (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210: 103-113.
- Weber, O. B., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. (2000) Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2227-2285.
- Weber, O.B.; Correia, D.; Silveira, M.R.S.; Crisóstomo, L.A.; Oliveira, E.M. & Sá, E.G. (2003) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:689-696.
- Weber, O. B., Cruz, L. M., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. (2001) Herbaspirillum-like Bacteria in Banana Plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 201-205.
- Weber, O.B., Lima, R.N., Crisóstomo, L.A., Freitas, J.A.D., Carvalho, A.C.P.P., Maia, A.H.N. (2009) Effect of Diazotrophic Bacterium Inoculation and Organic

Fertilization on Yield of Champaka Pine.apple Intercropped with Irrigated Sapota. *Plant and Soil*, 327:355-3

- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51:221-271.
- Woods, D., and Sokol, P. (2006). The Genus Burkholderia Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E, In "The Prokaryotes" .4.ed. New York: Springer Verlag New York, p:848-860.
- Yang, J., Kloepper, J. W., and Ryu, C.-M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14: 1-4.
- Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. (2008) Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1059-1065.
- Yin, T. T., Pin, U. L., and Ghazali, A. H. A. (2015) Influence of External Nitrogen on Nitrogenase Enzyme Activity and Auxin Production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). *Tropical Life Sciences Research*, 26: 101-110.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T.-H., Liu, G.-H., and Mao, C. (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*, 50: 112-117.
- Zietemann, C.; Roberto, S.R. (2007) Efeito de diferentes substratos e épocas de coletas no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. 'Paluma e Século XXI'. *Revista Brasileira Fruticultura*, 29: 31-36.