

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOTECNIA

TESE

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FLUORESCENTES
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE COUVE

ANELISE DIAS

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FLUORESCENTES
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE COUVE**

ANELISE DIAS

Sob a Orientação da Pesquisadora

Norma Gouvêa Rumjanek

e Co-orientação do Professor

Raul de Lucena Duarte Ribeiro

e do Pesquisador

Gustavo Ribeiro Xavier

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de Concentração
Agroecologia.

Seropédica, RJ

Setembro de 2011

635.34

D541c

T

Dias, Anelise, 1977-

Caracterização e seleção de bactérias fluorescentes promotoras do crescimento de couve / Anelise Dias - 2011.

155 f.

Orientador: Norma Gouvêa Rumjanek.

Tese(doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 115-138.

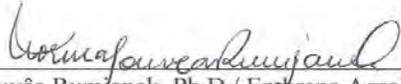
1. Couve - Crescimento - Teses. 2. Crescimento (Plantas) - Teses. 3. Pseudomonas - Teses. 4. Bactérias - Teses. I. Rumjanek, Norma Gouvêa, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

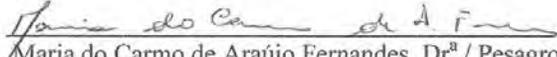
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ANELISE DIAS

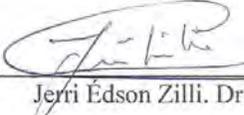
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração Agroecologia.

TESE APROVADA EM 23 de setembro de 2011.


Norma Gouvêa Rumanek. Ph.D./ Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)


Maria do Carmo de Araújo Fernandes. Dr.^a/ Pesagro Rio


Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Dr.^a/ UFRRJ


Jerri Édson Zilli. Dr./ Embrapa Agrobiologia


Fabio Lopes Olivares. Dr./ UENF

DEDICATÓRIA

À memória de meu pai

AGRADECIMENTOS

Mais uma vez, em uma centena de outras, recomeço a pensar em como agradecer às pessoas, pois com Deus eu já me arranjei. A palavra agradecimento pode ser entendida como um sinônimo de reconhecimento. Reconhecer o papel do outro nas nossas conquistas amplia os horizontes a que elas podem chegar por que nos permitem compartilhá-las, dividi-las e trazer alegria e realização para a vida das pessoas que nos ajudaram.

Quero começar agradecendo à minha mãe, Maria da Penha, que durante toda essa trajetória me apoiou incondicionalmente e à minha irmã Juliana Dias e ao meu irmão Francisco, que sempre me deram força e acreditaram em mim.

Agradeço ao meu marido Márcio pelo amor, incentivo, paciência, ajuda e compreensão.

Ao meu filho Pedro por me fazer tão feliz e à minha querida Taisinha pela ajuda, amor, paciência e carinho.

À Norma por ser minha grande professora, que acreditou no nosso trabalho, me deu credibilidade e tem me proporcionado a possibilidade de aprender sempre mais, como pessoa e como profissional.

Ao querido Professor Raul, pelos valiosos ensinamentos, carinho, zelo e paciência.

Ao Gustavo Xavier pelo exemplo de profissionalismo, pelo apoio e encorajamento para sair da “zona de conforto”.

A Silvana Gomes e ao Vinicius Vasconcelos por serem meus companheiros no laboratório e terem contribuído de forma decisiva para a realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório pelo companheirismo, pela “ciência”, “resenhase”, amizade, apoio, meios de cultura, ajuda e principalmente pela união...Viviane, Jakson, Sumaya, Fernanda, Elson, Dani, Bia, Carlos, Hendrew, Roberta, Débora, Rosana, João Luiz, Márcia, Luc, Bruno, Lorena, Isabelle, Andréa, Claudinha Alencar & Samuel Passos, muito obrigada!

Aos funcionários da Embrapa, especialmente ao Geraldo Baeta, Claudinho, Serginho e Senhor Aurélio.

RESUMO

DIAS, Anelise. **Caracterização e Seleção de Bactérias Fluorescentes Promotoras do Crescimento de Couve**. 2011. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Uma coleção de 189 isolados bacterianos, provenientes de sistema orgânico de produção de hortaliças, foi caracterizada com vistas à seleção de estirpes promotoras do crescimento de couve. Os isolamentos foram realizados a partir da rizosfera de hortaliças e do solo após colheita das espécies cultivadas. A grande maioria das estirpes apresentou perfil bioquímico idêntico a *Pseudomonas* (grupo fluorescente). Enquanto perfis idênticos a *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* constituíram outros grupos de representantes. A caracterização dos isolados levou em conta a capacidade de síntese de compostos possivelmente envolvidos em mecanismos de estímulo ao crescimento de plantas, a saber: biofilmes, sideróforos, acil-lactonas homoserinas (ALHs), ácido indol-3-acético (AIA) e compostos indólicos relacionados, além da solubilização de fosfato de cálcio. Um total de 94 isolados foi testado na casa de vegetação quanto à capacidade de promover o crescimento de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) em vasos contendo solo distrófico não esterilizado. Paralelamente, foram avaliados consórcios entre componentes da coleção e rizóbios para igual finalidade. Em adendo, foram comparados os efeitos da aplicação de determinados isolados produtores de AIA e da aplicação de AIA sintético sobre o crescimento da couve. Os experimentos de laboratório indicaram que, *in vitro*, 100% dos isolados formaram biofilme, 71% sintetizaram sideróforos, 31% produziram AHLs, 95% produziram AIA e 74% solubilizaram P. No entanto, os bioensaios na casa de vegetação evidenciaram que apenas 11% dos isolados bacterianos induziam respostas significativas de promoção do crescimento da couve. Desses, um subgrupo formado por 10 estirpes de rizobactérias conferiu incrementos nos parâmetros de crescimento, tanto da biomassa aérea quanto do sistema radicular da hortaliça. Biofilmes, sideróforos, AIA e solubilização do P foram características comuns do subgrupo. Não foi observado efeito sinérgico entre os isolados em consórcios, embora tenha sido verificado que as duas estirpes de rizóbios consorciadas promoveram o crescimento das plantas inoculadas. Os isolados R1132 e S311 foram superiores à aplicação do AIA sintético. Os resultados obtidos sinalizaram o potencial de 12 bactérias que promover o crescimento das plantas e incrementar a produção de couve.

Palavras-chave: promoção do crescimento de plantas, auxina, solubilização de fosfato de cálcio.

ABSTRACT

DIAS, Anelise. **Characterization and Selection of Cabbage Growth Promoting Fluorescent Bacteria**. 2011. 151 p. Thesis (Doctor Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A collection of 189 bacterial isolates, obtained from organic system of vegetable production, was characterized aiming to selection of cabbage growth promoting strains. Isolatings were performed from rhizosphere of vegetables and soil after harvest of cultivated species. The vast majority of the strains showed biochemical profiles identical to *Pseudomonas* (fluorescent group). While profiles identical to *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* and *Acinetobacter* constituted other groups of representatives. Characterization of isolates took into account the capacity for synthesis of compounds possibly involved in mechanisms to stimulate plant growth, namely: biofilms, siderophores, acyl homoserine lactones (AHLs), indole-3-acetic acid (IAA) and indole related compounds, as well as solubilization of calcium phosphate. A total of 94 isolates were evaluated in the greenhouse for their ability to promote the growth of cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala*) in pots containing unsterilized loam soil. In addition, consortia were evaluated between components of the collection and rhizobia for the same purpose. In addition, it compared the effects of application of certain producing IAA isolates and the application of synthetic IAA on the growth of cabbage. Laboratory experiments showed that in vitro, 100% of the isolates formed biofilm, 71% synthesized siderophores, 31% produced AHLs, 95% produced IAA and 74% solubilized P. However, bioassays in the greenhouse showed that only 12% of the isolates induced significant responses to promote the growth of cabbage. Of these, a subgroup composed of 10 strains of rhizobacteria given increments in growth parameters of both the biomass and the root system of vegetables. Biofilms, siderophores, IAA and solubilization of P were common characteristics of the subgroup. No synergistic effect was observed among isolates in consortia, although it was found that the two strains of rhizobia consortium promoted the growth of inoculated plants. The isolates R1132 and S311 were higher than the application of synthetic IAA. The results suggested the potential of 12 bacteria to promote plant growth and increase production of cabbage.

Key words: plant growth promoting, auxin, solubilization of calcium phosphate.

Lista de figuras

Quadro I. Reclassificação de antigas espécies de <i>Pseudomonas</i> e outras não classificadas no grupo I - <i>Pseudomonas strictu sensu</i> (ANZAI et al. 2000; PEIX et al., 2009).	25
Figura 1. Curva-padrão relacionado a absorvância ($\lambda = 540$ nm) e a concentração de AIA sintético	51
Figura 2. Formação de biofilmes nas paredes de tubos de ensaio por rizobactérias fluorescentes. Coloração com safranina ($0,05 \text{ g l}^{-1}$). Os biofilmes são indicados pelas setas. .	63
Figura 3. Isolado fluorescente R163 obtido da rizosfera de rúcula crescido em meio King B por 24 h. (Placa de Petri fotografada sob luz natural à esquerda e iluminada com luz ultravioleta à direita).	66
Figura 4. Detecção da biossíntese de acil-lactonas homoserinas por bactérias isoladas de hortaliças em meio de cultivo contendo a estirpe repórter NT1 de <i>A. tumefaciens</i> . A coloração azul do meio indica resultado positivo.	69
Figura 5. Exemplos de produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados por rizobactérias fluorescentes isoladas de hortaliças de acordo com classes arbitradas conforme a concentração de regulador produzida . Classes: I. não produziu; II. produziu até $10 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ UDO}^{-1}$; III. produziu mais do que 10 até $25 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ UDO}^{-1}$; IV. produziu mais do que 25 até $100 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ UDO}^{-1}$ e V. produziu mais do que $100 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ UDO}^{-1}$	71
Figura 6. Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças com alta eficiência de solubilização.	75
Figura 7. Solubilização de monofosfato de cálcio por bactérias fluorescentes obtidas do solo e da rizosfera de hortaliças. Isolados com baixa eficiência de solubilização: C317 e C323; Isolados com alta eficiência de solubilização: SA32 e R123.	76
Figura 8. Relação entre o halo de solubilização de fosfato monocálcico e a colônia dos isolados da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças.	76
Figura 9. Matéria seca de raiz de couve inoculada com rizobactérias provenientes de hortaliças.	79
Figura 10. Promoção do crescimento de couve de folha por rizobactérias isoladas de hortaliças.	81

Figura 11. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre o percentual de incremento médio da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....99

Figura 12. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre o crescimento de couve de folha. A. rizobactérias: R1132 e S3103 e rizóbios: BR 3267 e BR 3299. B. Efeito das rizobactérias consorciadas.103

Figura 13. Efeito sobre o crescimento de plantas de couve de folha com a inoculação do isolado R1132 em comparação à testemunha e ao ácido indol-3-acético ($13,24 \mu\text{g ml}^{-1}$).110

Lista de Tabelas

Tabela 1. Medida de absorvância no comprimento de onda de 540 nm de soluções de AIA sintético produzidas a partir de uma solução a 1 mg.ml-1.....	51
Tabela 2. Frequência de isolados de solo pós-cultivo de hortaliças positivos para as reações do sistema API 20NE. Testes: NIT= redução de nitrato a nitrito ou azoto; TRP = degradação do triptofano; GLU = fermentação da glicose; ADH = produção de arginina dihidrolase; URE = produção de urease; ESC = hidrólise da esculina; GEL = hidrólise da gelatina; PNPG = p-nitrofenil-b-galactopiranosidase; GLU = utilização da D-glicose; ARA = arabinose; MNE = manose; MAN= manitol; NAG = n-acetil-glicosamina; MAL = maltose; GNT = gluconato de potássio; CAP = caprato; ADI = adipato; MLT = malato; CIT = citrato de trisódio; PAC = ácido fenil-acético.....	58
Tabela 3. Detecção da biossíntese de sideróforos por bactérias isoladas de hortaliças. A coloração do meio está associada ao grupamento coordenador do ferro presente no sideróforo: amarelo: ácidos hidroxicarboxílicos; verde, ou laranja: hidroxamatos e roxo: catecolatos (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).	64
Tabela 4. Distribuição dos isolados de pseudomonas fluorescentes isolados da rizosfera e do solo pós-cultivo de hortaliças em classes arbitradas de acordo com o nível de produção de compostos indólicos.....	70
Tabela 5. Eficiência de Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias fluorescentes obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Avaliações foram realizadas aos 3, 6, 9 e doze dias de cultivo em meio GL contendo fosfato monocálcico. Médias de seis repetições. IS = índice de solubilização; ES = eficiência de solubilização.	74
Tabela 6. Efeito da inoculação de bactérias fluorescentes provenientes de solo pós-cultivo de hortaliças sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (<i>Brassica oleraceae</i> cv. <i>acephala</i>) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições.....	77
Tabela 7. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (<i>Brassica oleraceae</i>) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio V).....	79

Tabela 8. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (<i>Brassica oleraceae</i> cv. <i>acephala</i>) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (Ensaio VI).....	80
Tabela 9. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (<i>Brassica oleraceae</i> cv. <i>acephala</i>) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio VII).....	82
Tabela 10. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (<i>Brassica oleraceae</i> cv. <i>acephala</i>) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio VIII).	82
Tabela 11. Efeito da inoculação de bactérias obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças sobre o percentual da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação. A. Ensaios de I até IV; B. Ensaios de V até VIII.....	86
Tabela 12. Caracterização bioquímica (Sistema Api 20NE, Biomerieux) e sequenciamento do gene 16S RNAr de rizobactérias promotoras do crescimento de couve (na: não foi avaliada).90	
Tabela 13. Caraterização de rizobactérias promotoras do crescimento de couve quanto à formação de biofilmes (BF), produção de sideróforos, de acil lactonas homoserinas (ALH), de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e eficiência de solubilização de fosfato monocálcico (ES).....	92
Tabela 14. Capacidade de isolados de rizosfera e solo pós-cultivo de hortaliças quanto à síntese <i>in vitro</i> de acil lactonas homoserinas (ALH), biofilmes (BF), sideróforos (SID), e ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e de solubilização de fosfato monocálcico (SF), e à promoção de crescimento de plantas de couve (<i>B. oleraceae</i> var. <i>acephala</i>) em casa de vegetação (PC).	94

Tabela 15. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.99

Tabela 16. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.101

Tabela 17. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre o percentual de incremento médio da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação.....102

Tabela 18. Produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e o efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca das raízes (MSR), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca total (MFT), área foliar (AF), comprimento da raiz principal (LR), número de raízes secundárias (RS), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) e área radicular (AR) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação.105

Tabela 19. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes e o equivalente em AIA sintético sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca das raízes (MSR), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca total (MFT), área foliar (AF), comprimento da raiz principal (LR), número de raízes secundárias (RS), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) e área radicular (AR) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições.....107

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 O gênero Pseudomonas	22
2.2 Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal	27
2.2.1 Mecanismos diretos de promoção do crescimento de plantas por pseudomonas fluorescentes	28
2.2.2 Produção de auxinas	29
2.2.3 Solubilização de fosfatos insolúveis	30
2.2.4 Outros mecanismos de promoção do crescimento de plantas sob estresse abiótico: atividade da ACC desaminase e biossíntese de exopolissacarídeos	32
2.3 Competência rizosférica e produção de sideróforos	35
2.4. Regulação da produção de metabólitos em pseudomonas	37
2.4.1 Quorum sensing	37
2.4.2 Exsudatos de sementes e raízes	39
2.4.3 Toxinas	43
2.4.4 Fatores abióticos	43
2.4.5 Metais pesados e elementos traço	45
3 OBJETIVO GERAL	47
3.1 Objetivos Específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Origem e caracterização dos isolados	48
4.1.1 Isolados de rizosfera	48
4.1.2 Isolados de solo	48
4.2 Caracterização dos isolados	49
4.2.1 Caracterização bioquímica	49
4.2.2 Detecção da produção de biofilmes	49

4.2.3 Produção de sideróforos.....	49
4.2.4 Detecção da produção de ALHs	49
4.2.5 Produção de ácido indol-acético e compostos indólicos	50
4.2.6 Solubilização de fosfato de cálcio insolúvel	52
4.3 Promoção de crescimento.....	52
4.3.1 Caracterização dos isolados	52
4.3.3 Avaliação da inoculação de consórcio de rizobactérias na promoção de crescimento da couve	53
4.3.4 Avaliação da inoculação de consórcio de rizobactérias e estirpes de rizóbio eficientes para a inoculação de feijão caupi na promoção de crescimento de couve.....	54
4.4 Avaliação do efeito da concentração de AIA na promoção de crescimento em mudas de couve.....	55
4.5 Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rRNA	56
4.6 Sequenciamento do gene 16S RNAr.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Isolamento e caracterização de bactérias fluorescentes de solo pós-cultivo de hortaliças.....	57
5.2 Detecção da produção de biofilmes	63
5.3 Detecção da produção de sideróforos.....	64
5.4 Detecção da produção de autoindutores ALHs.....	67
5.5 Detecção da produção de AIA e compostos indólicos relacionados	70
5.6 Solubilização de fosfato de cálcio insolúvel	73
5.7 Promoção do crescimento da couve	76
5.8 Caracterização das bactérias promotoras do crescimento da couve	90
5.9 Características bioquímicas in vitro dos isolados estudados e a promoção de crescimento da couve na casa de vegetação.....	93
5.10 Efeito do consórcio de rizobactérias e do consórcio de rizobactérias e rizóbios no crescimento de couve	98

5.10.1 Consórcio de rizobactérias	98
5.10.2 Consórcio de rizobactérias e rizóbio	100
5.11 Promoção de crescimento e produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
7. CONCLUSÕES	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

ANEXOS

Anexo A - Origem e caracterização bioquímica de isolados fluorescentes obtidos a partir de solo de canteiro pós-cultivo de hortaliças sob sistema orgânico. identificação com o KIT API 20NE (Biomérieux) de rizobactérias fluorescentes isoladas a partir da rizosfera de hortaliças cultivadas sob sistema orgânico. ID = percentual de identificação, T = índice t; testes: NIT= redução de nitrato a nitrito ou azoto; TRP = degradação do triptofano; GLU = fermentação da glicose; ADH = produção de arginina dihidrolase; URE = produção de urease; ESC = hidrólise da esculina; GEL = hidrólise da gelatina; PNPG = p-nitrofenil-b-galactopiranosidase; GLU = utilização da D-glicose; ARA = arabinose; MNE = manose; MAN= manitol; NAG = n-acetil-glicosamina; MAL = maltose; GNT = gluconato de potássio; CAP = caprato; ADI = adipato; MLT = malato; CIT = citrato de trisódio; PAC = ácido fenil-acético.139

Anexo B - Biossíntese de compostos indólicos por bactérias fluorescentes obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Médias de três repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.142

Anexo C - Índice e Eficiência de Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Avaliações foram realizadas aos 3, 6, 9 e doze dias de crescimento. Médias de seis repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IS = índice de solubilização; ES = eficiência de solubilização.146

Anexo D - Efeito da inoculação de rizobactérias avaliadas nos ensaios II, III e IV, sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições..153

1 INTRODUÇÃO

A horticultura brasileira é caracterizada pela variedade, representada pela comercialização de mais de dez famílias botânicas. A qualidade nutricional das hortaliças é reconhecida devido ao elevado teor de sais minerais e vitaminas e está relacionada à melhoria do sistema imunológico e prevenção de doenças vasculares, cânceres e diabetes. No Brasil, o consumo está condicionado à renda das famílias e ainda se mostra aquém do recomendado pela Organização Mundial da Saúde que é de 6% a 7% das calorias totais ingeridas (WHO, 2004). Sessenta por cento da produção tem origem em propriedades de menos de 10 hectares, com exploração típica do sistema de agricultura familiar. O faturamento da cadeia de produção de hortaliças atualmente corresponde a 12,4% do Produto Interno Bruto relativo ao agronegócio, que é de R\$ 163,5 bilhões (CORRÊA et al., 2010). O setor tem amplo potencial para crescer no Brasil considerando o atendimento aos mercados interno e externo.

O enriquecimento da rizosfera dessas plantas com bactérias probióticas ou promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) é uma estratégia que pode contribuir para a produção de hortaliças de alta qualidade. Dentre essas, as pseudomonas fluorescentes representam um dos principais grupos bacterianos cultiváveis da rizosfera. São cosmopolitas e já foram encontradas no interior de plantas, flores e frutos (COMPANT et al., 2010; HARDOIM et al., 2008,) e, mais recentemente, foram reportadas induzindo a formação de nódulos radiculares em *Robinia pseudoacacia* (SHIRAISHI et al. 2010).

Pseudomonas estimulam o sistema radicular de plantas inoculadas, o que aumenta a estabilidade de cultivo propiciando maior tolerância das plantas a veranicos, incrementando a exploração do solo pelas raízes e melhorando a aquisição de água e nutrientes (GLICK, 2010; YANG et al. 2009).

Essas bactérias também podem maximizar a eficiência no uso de fertilizantes, reduzindo os custos econômicos e ambientais que os adubos minerais representam para a horticultura, especialmente em regiões onde o custo desses produtos é elevado. Bactérias do grupo das pseudomonas produzem ácidos orgânicos que são considerados importantes na solubilização de P. Este mecanismo é vantajoso para a sobrevivência de bactérias no solo e pode beneficiar a planta hospedeira ao aumentar a disponibilidade de P, normalmente limitada na maior parte dos solos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; KHAN et al., 2009).

Entre os atributos das pseudomonas que são associados à promoção do crescimento de plantas, a produção de ácido indol-3-acético (AIA) tem sido considerada como um dos mecanismos chave. A produção de AIA e outros compostos relacionados podem alterar o pool de auxinas na planta provocando modificações morfológicas nas raízes, como por exemplo, encurtamento da raiz principal e proliferação de raízes secundárias e de pelos absorventes que maximizam a absorção de água e nutrientes.

A produção de sideróforos e biofilmes são estratégias que favorecem o estabelecimento das populações de BPCPs nas raízes. Sideróforos são importantes para a competição pelos nichos rizosféricos. Assumem uma dupla função na competição, podendo levar a uma depleção localizada de ferro ou atuarem como antibióticos, sendo, inclusive, relacionados à supressividade de solos a fungos fitopatogênicos (LEMANCEAU et al., 2007).

Biofilmes são matrizes complexas em que as bactérias apresentam cooperação metabólica. Sua produção tem sido frequentemente relacionada à produção de sinalizadores como lactonas homoserinas que coordenam a expressão gênica de diversos metabólitos, tais como sideróforos e antibióticos em pseudomonas que apresentam *quorum sensing*. Os biofilmes protegem as bactérias artificialmente introduzidas no solo e nas sementes favorecendo a manutenção de densidade populacional suficiente para propiciar a formação de interações benéficas com o hospedeiro (DANHORN & FUQUA, 2007).

Em ensaios *in vitro*, a capacidade de produzir AIA está presente em mais de 80% das bactérias cultiváveis da rizosfera, enquanto mais de 40% dessas populações são hábeis em solubilizar P (SPAEPEN et al. 2007). Essas características têm sido reconhecidas como vantajosas para um programa de seleção de bactérias para o desenvolvimento de inoculantes visando à promoção de crescimento de hortaliças e outras culturas. No entanto, avaliando apenas as bactérias que promovem o crescimento das plantas em condições naturais, essas características estão presentes em cerca de 10% dessas populações. A expressão desses fenótipos depende diretamente da competência rizosférica, ou seja, a habilidade do isolado bacteriano para atingir as raízes e colonizar sua superfície (LYNCH, 1990).

Pseudomonas fluorescentes são reconhecidas como bactérias que possuem elevada competência rizosférica. Não têm exigências nutricionais, são generalistas podendo utilizar uma variedade de compostos presentes nos exsudatos de várias espécies vegetais, incluindo os ácidos orgânicos que são considerados determinantes para a colonização rizosférica.

Em geral, a competitividade de BPCPs na rizosfera depende da capacidade de sobrevivência frente aos estresses e de multiplicação utilizando como fonte de nutrientes exsudatos radiculares. A população de uma estirpe bacteriana artificialmente introduzida pode declinar rapidamente frente à competição com a biota residente, à predação por protozoários e à quantidade e composição dos exsudatos radiculares. Nesse sentido, não só características favoráveis à promoção de crescimento devem ser consideradas durante o processo de seleção, mas também a competência rizosférica, o que torna mais complexa a identificação de isolados promissores.

Considerando todos os fatores conhecidos que estão envolvidos na atividade das BPCPs é comum se encontrar uma variabilidade de respostas à inoculação com estirpes promissoras. Esse é um tópico que precisa ser melhor investigado visando o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem as características vantajosas encontradas nesses recursos biológicos que podem contribuir para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Pseudomonas têm sido avaliadas também em consórcios com outros grupos benéficos, tais como, bacilos e rizóbios para a promoção de crescimento principalmente de leguminosas. Existem evidências que relatam o efeito sinérgico do consórcio formado a partir desses grupos bacterianos sobre o crescimento de várias espécies vegetais o que têm sido cogitado como uma estratégia capaz de reduzir a variabilidade de resposta à inoculação.

Em sistemas agroecológicos, as práticas de manejo e conservação do solo, diversificação de cultivos e nutrição equilibrada favorecem a diversidade microbiana no solo e possivelmente BPCPs (ALTIERI, 1999; FERNANDES et al., 2005). Baseando-se nessa hipótese, a obtenção de populações de *pseudomonas* foi realizada no presente estudo, partir de solo pós-cultivo e rizosférico de hortaliças cultivadas na “Fazendinha Agroecológica Km 47”.

A obtenção de *pseudomonas* a partir de solo pós-cultivo pode favorecer a seleção de cepas que atuam como saprófitas e competem ativamente com fungos fitopatogênicos não obrigatórios que sobrevivem no solo, como por exemplo, *Rhizoctonia solani* (SNEH et al., 1996). Por outro lado, o isolamento de *pseudomonas* a partir da rizosfera das plantas alvo, pode favorecer a obtenção de isolados benéficos que (i) detêm capacidade para se estabelecerem nesse nicho por utilizarem os compostos disponíveis nos exsudatos radiculares, (ii) competem com populações de fungos e bactérias deletérios ao crescimento vegetal, e (iii) estimulam o crescimento das plantas, sendo que essas características favorecem o

estabelecimento de estirpes selecionadas a partir de inoculações artificiais (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

No Brasil não existem produtos registrados no MAPA contendo bactérias do grupo das pseudomonas como ingrediente ativo (AGROFIT, 2011), ao contrário dos EUA e Europa onde espécies de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis* são comercializadas para a promoção de crescimento e controle biológico (APS, 2011; ALABOUVETTE, 2006).

A despeito dos mecanismos de promoção de crescimento serem amplamente reconhecidos pouco é conhecido sobre a diversidade e potencial das BPCPs no Brasil. A seleção destas bactérias representa uma grande oportunidade para melhorar a produção de hortaliças e reduzir os custos com fertilizantes minerais ao exemplo do que já foi alcançado com as culturas da soja, do feijão-caupi e, mais recentemente, com a cana-de-açúcar (RUMJANEK et al. 2005, SILVA et al. 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Pseudomonas*

As espécies do gênero *Pseudomonas* apresentam diversidade de habitats e nichos ecológicos e podem ser encontradas no solo e no interior de animais e plantas (BERG, 2009). Estabelecem relações ecológicas positivas, negativas ou neutras com seus hospedeiros e com a comunidade associada. Algumas espécies são reconhecidas como promotoras de crescimento de plantas, entre elas citam-se *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis* que já são veiculadas em produtos para biocontrole de fungos fitopatogênicos habitantes do solo (CHOUDHARY et al., 2009). Algumas espécies são consideradas patogênicas a seres humanos e outros animais, sendo que a espécie *P. aeruginosa* tem sido apontada como um dos principais agentes de infecções nosocomiais em pacientes imunodeprimidos (BERG, 2009). A espécie *P. syringae* contém 36 patovares que infectam diferentes espécies de plantas (KIMURA & RIBEIRO, 1994; PEIX et al., 2009). A distribuição cosmopolita do gênero sugere uma alta adaptabilidade genética e fisiológica e tem sido relacionada à presença de inúmeras ilhas genômicas. Como consequência, esse grupo bacteriano é cada vez mais estudado tendo em vista a seleção de estirpes para diversas aplicações biotecnológicas (SPIERS et al., 2000; BATTLE et al., 2009).

A primeira descrição do gênero *Pseudomonas* foi realizada pelo botânico Walter Emil Friedrich August Migula em 1894 motivada pelo interesse na descrição de bactérias fitopatogênicas (SCHLEIFER, 2009). Desde então o gênero passou por várias alterações em função do número de espécies incluídas e também do critério usado para sua definição. Estas mudanças acompanham a evolução da taxonomia de bactérias que tem sido fortemente influenciada pelo surgimento de novas técnicas.

Na primeira edição do Manual de Bergey (1923), as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram caracterizadas como bastonetes Gram-negativos, aeróbicos estritos, sem estruturas de resistência e móveis por meio de flagelos polares. Essa classificação fenotípica permitiu que bactérias pertencentes a outras subclasses, gêneros e espécies fossem classificadas como pseudomonas (PEIX et al., 2009).

Na década de 1960, Stanier et al. (1966) usando requisitos nutricionais, propuseram uma nova subdivisão do gênero, composta por espécies fluorescentes: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* englobando sete biovars (A até G) e *P. putida* com apenas dois biovars (A e B). Nessa época, foram ainda iniciados estudos com o DNA visando a classificação filogenética bacteriana. Palleroni et al. (1973) usando hibridização de DNA definiram uma divisão do gênero *Pseudomonas* em cinco grupos de homologia. Os resultados sugeriam uma considerável distância entre os representantes desses grupos, permanecendo como *Pseudomonas stricto sensu* apenas os representantes do grupo I, sendo *P. aeruginosa* a espécie tipo. Em seguida, na edição do Manual de Bergey de 1974 o conteúdo G+C foi utilizado para a inclusão do gênero *Pseudomonas* na família Pseudomonadaceae caracterizada por bactérias aeróbicas, Gram-negativas, móveis, com alguns representantes desnitrificadores (PEIX et al., 2009). As espécies com descrição fenotípica foram distribuídas em dois grupos e alguns subgrupos de acordo com a necessidade de fatores específicos de crescimento *in vitro*: uso de DL-arginina e betaína como fontes de carbono, crescimento autotrófico com hidrogênio, produção de polihidroxibutirato (PHB), presença de pigmentos fluorescentes, atividade de arginina dihidrolase e reação de desnitrificação.

Os estudos de homologia de DNA-DNA realizados por Palleroni só foram considerados na primeira edição do Manual de Bergey de Bacteriologia e Sistemática lançada em 1984. A partir daí, o gênero *Pseudomonas* foi incluído no capítulo correspondente aos bacilos aeróbicos, Gram-negativos. Nessa edição o arranjo das espécies já mencionava os

grupos de RNA ribossomal. No entanto, a identificação continuou baseada nas características fenotípicas (PALLERONI, 1984).

Os estudos de Carl Woese com cronômetros filogenéticos baseados no gene 16S RNAr referendaram de forma marcante a conceituação taxonômica de procariontes (WOESE et al., 1985). Desde então, seqüências desse gene de todas as bactérias conhecidas foram sendo progressivamente depositadas em bancos de dados. O seqüenciamento validou a classificação das espécies de pseudomonas nos grupos de homologia descritos anteriormente por Palleroni. As *Pseudomonas strictu sensu* foram incluídas na subclasse gama-Proteobacteria, compreendendo as espécies do grupo I que foram divididas, com base no sequenciamento do gene 16S RNAr, em sete subgrupos representados pelas espécies tipo: *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* e *P. pertucinogena* (ANZAI et al., 2000). As espécies do grupo II: *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. cepacia* e *P. gladioli* foram reclassificadas no gênero *Burkholderia* enquanto *P. pickettii* e *P. solanacearum* no gênero *Ralstonia*. As espécies do grupo III: *P. facilis*, *P. delafieldii*, *P. avenae* e *P. catleyae* foram reclassificadas no gênero *Acidovorax*. Os gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Acidovorax* foram transferidos para a subclasse beta-Proteobacteria. As espécies do grupo IV: *P. diminuta* e *P. vesicularis* foram reclassificadas em 1994 em *Brevundimonas* (alfa-Proteobacteria) e *Xanthomonas maltophilia*, foi reclassificada como *Stenotrophomonas maltophilia* e continua na subclasse gama-Proteobacteria (PALLERONI, 2005; YABUUCHI et al., 1995; ANZAI et al., 2000; PALLERONI, 2005; PEIX et al., 2009). A tendência atual a partir da década de 2000 é restringir o gênero às espécies do grupo I, *Pseudomonas strictu sensu* (ANZAI et al., 2000) (**Quadro I**).

Quadro I. Reclassificação de antigas espécies de *Pseudomonas* e outras não classificadas no grupo I - *Pseudomonas strictu sensu* (ANZAI et al. 2000; PEIX et al., 2009).

Espécie original	Gênero e Espécie atuais	Subclasse	Referências
<i>P. mallei</i> , <i>P. pseudomallei</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. cepacia</i> e <i>P. gladioli</i> (antigo grupo II)	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. caryophylli</i> , <i>B. cepacia</i> e <i>B. gladioli</i>	β -Proteobacteria	YABUUCHI et al., 1992,
<i>P. pickettii</i> e <i>P. solanacearum</i> (antigo grupo II)	<i>Ralstonia pickettii</i> e <i>R. solanacearum</i>	β -Proteobacteria	YABUUCHI et al., 1995,
<i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. avenae</i> e <i>P. catleyae</i> (antigo grupo III)	<i>Acidovorax facilis</i> , <i>A. delafieldii</i> , <i>A. avenae</i> e <i>A. catleyae</i>	β -Proteobacteria	WILLEMS et al., 1990
<i>P. diminuta</i> e <i>P. vesicularis</i> (antigo grupo IV)	<i>Brevundimonas diminuta</i> e <i>B. vesicularis</i>	α -Proteobacteria	SEGERS et al., 1994
<i>P. doudoroffii</i>	<i>Oceanomonas doudoroffii</i>	γ -Proteobacteria	BROWN et al., 2001
<i>P. stanieri</i>	<i>Marinomonas stanieri</i>	γ -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009
<i>P. beijerinckii</i>	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i>	γ -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009
<i>P. indigofera</i>	<i>Vogesella indigofera</i>	α -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009
<i>P. woodsii</i>	<i>Burkholderia woodsii</i>	α -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009
<i>P. echinoides</i>	<i>Sphingomonas echinoides</i>	α -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009
<i>P. aureofaciens</i> e <i>P. aurantiaca</i>	<i>P. chlororaphis</i>	γ -Proteobacteria	EUZÉBY, 2010; PEIX et al., 2009

Atualmente, a descrição de novas espécies do gênero *Pseudomonas* segue a tendência da moderna taxonomia que utiliza estudos polifásicos para identificação de procariotos. As espécies polifásicas são caracterizadas por um grau de consistência fenotípica, por um grau significativo de hibridização DNA-DNA e por mais de 97 % de similaridade na seqüência do gene 16S rRNA (GILLIS et al., 1996). Várias técnicas são utilizadas em conjunto e em função do nível de resolução taxonômica podem ser agrupadas em três categorias: (1) aquelas com ampla resolução e impacto sobre as conclusões filogenéticas baseadas em rRNA; (2) aquelas

que revelam diferenças ao nível de espécie e (3) aquelas capazes de agrupar estirpes com características semelhantes (GILLIS et al., 1996).

Os estudos quimiotaxonômicos do gênero *Pseudomonas* envolvem os sistemas de quinonas, ácidos graxos, proteínas e lipídeos polares (perfis de poliaminas). Dentre as principais dificuldades da utilização de características fenotípicas, destacam-se a baixa reprodutibilidade dos resultados em função das diferenças observadas entre a densidade de inóculo, a temperatura e o tempo de incubação, a composição e a relação superfície e volume dos meios de cultivo e, por fim o critério utilizado para considerar as reações positivas ou negativas. Assim, o uso de multitestes comerciais como API 20NE (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) é conveniente, pois permite uma padronização e melhor reprodutibilidade (KRIEG & HOLT, 2005). O API 20NE abrange 61 táxons e identifica bactérias aeróbias, Gram-negativas, não entéricas e não fastidiosas, através de testes enzimáticos e de assimilação de compostos de carbono. Este sistema é adequado para a identificação de espécies de *Pseudomonas*, em especial isoladas de espécimes clínicas, mas é falho quando se trata de amostras ambientais, pela limitação do banco de dados existente e do pequeno número de testes, assim é uma ferramenta poderosa para geração de um perfil metabólico e não para a identificação *per si* (BEHRENDT et al., 1999; PEIX et al., 2003).

A caracterização genotípica geralmente utiliza os genes 16S, região intergênica 16S-23S e 23S, assim como o sequenciamento do RNAr que são considerados *gold standards* para a dedução de relações filogenéticas (THOMPSON et al., 2002) Esses genes são considerados estáveis e menos sujeitos às transferências laterais. O gene 16S RNAr de *Pseudomonas* contém 1492 nucleotídeos, dos quais 148 são variáveis e dentre esses 65 são hipervariáveis (CHOUDARY, 2009). Apesar do gene 16S rRNA representar ainda a base para a classificação, ele não é apropriado para algumas espécies, entre estas, incluem-se *P. putida* e *P. fluorescens* (FONSECA, 2003). Outras seqüências genéticas com maior poder de resolução vêm sendo buscadas de modo a tornar a utilização do sequenciamento do DNA mais eficiente para a diferenciação de espécies citando-se os genes housekeeping e MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) que tem mostrado importância crescente para a sistemática bacteriana ao nível intraespecífico (STACKERBRANDT, 2002). Métodos baseados em loci acompanham as mudanças evolutivas mais rapidamente do que genes do RNAr e a utilização de múltiplos genes exerce um efeito tampão contra os efeitos de distorção de recombinação que podem ocorrer em um único locus. A análise de genes housekeeping ainda não é comumente

utilizada na descrição de espécies em função da limitação dos bancos de dados existentes (Gevers et al. 2005). Em 2008 foi criado um banco de dados na Espanha chamado PseudoMLSA (WWW.uib.es/microbiologiaBD/welcome.html) que guarda sequências de múltiplos genes de estirpes tipo de pseudomonas visando a criação de uma base ampla para o MLSA ao exemplo do que existe hoje para o gene 16S RNAr e a substituição da técnica de hibridização para identificação de espécies. A lista de genes inclui operons (16S RNAr, 23S RNAr e o espaço intergênico ITS1 e os genes de RNAt-Ala e RNAt-Ile), genes housekeeping (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *rpoD*) e os genes funcionais (*car*, *cat*, *nir*, *nor*, *nos*) (BENNASAR et al., 2010).

A introdução de novas metodologias de caracterização e identificação implica em alterações significativas na taxonomia bacteriana. Nesse sentido, é possível que a classificação atual do gênero *Pseudomonas* sofra ainda muitas modificações, não obstante algumas bases têm sido amplamente aceitas pela comunidade de microbiologistas como The Approved Lists of Bacterial Names (EUZÉBY, 2010: <http://www.bacterio.cict.fr/>), o Manual Bergeys of Systematic Bacteriology e o “Taxonomic Outline of the Prokaryotes” <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/issue/current>) (GARRITY et al., 2007).

Na classificação mais recente encontram-se 128 espécies no gênero *Pseudomonas*, pertencentes à subclasse gama-Proteobacteria divididas em dois grandes grupos: fluorescentes e não fluorescentes. O grupo fluorescente inclui espécies: (1) fitopatogênicas com presença de citocromo c oxidase (*P. cichorii*, *P. marginalis* e *P. tolaasii*); (2) não fitopatogênicas e não necrogênicas (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. aeruginosa*); e (3) fitopatogênicas, necrogênicas e com citocromo c oxidase ausente (*P. syringae* e *P. viridiflava*). Ao grupo não fluorescente pertencem as espécies: *P. stutzeri*, *P. mendocina* e *P. alcaligenes* (CHOUDARY et al., 2009).

2.2 Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Bactérias fluorescentes do grupo pseudomonas são reconhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) devido à capacidade de biossíntese de reguladores de crescimento, ácidos orgânicos, ACC desaminase e exopolissacarídeos, bem como de atuar como antagonísticas a fitopatógenos habitantes do solo (COMPANT et al., 2010; GLICK et al., 2007). Vários estudos evidenciaram a capacidade dessas rizobactérias na promoção do crescimento de inúmeras espécies de plantas cultivadas, como, por exemplo, tomate (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002), alface (SOTTERO et al., 2006), pepino (LUCON et al.,

2008), milho (MARULANDA et al., 2009), couve (PINTON et al., 2010), algodão (YAO et al., 2010), abacaxi (BALDOTTO et al., 2010), dentre outros.

Em geral, o sistema radicular das plantas inoculadas com RPCPs é bem desenvolvido, o que por sua vez, favorece o crescimento da parte aérea. Por outro lado, a maior abundância de raízes estimula as populações de rizobactérias favorecendo o estabelecimento de diversos grupos bacterianos benéficos, como as bactérias diazotróficas (SILVA et al., 2009).

Além de características associadas diretamente à promoção do crescimento de plantas, estudos comprovam que as pseudomonas fluorescentes produzem diversos antibióticos e apresentam atividade antagonística a fungos fitopatogênicos habitantes do solo. O fato de essas bactérias apresentarem elevada competência rizosférica tem sido associado ao sucesso como agente de biocontrole. A produção de diversos metabólitos, tais como: fenazinas, pioluterinas, di-acetil-fluoroglucinois (YAN et al., 2007; SALMAN, 2010; SHANMUGAIAH et al., 2010); compostos orgânicos voláteis (KAI et al., 2007); ácido cianídrico (HAAS & DEFAGO, 2005); sideróforos (KAPSALIS et al., 2008) e enzimas líticas (ARORA et al., 2007) e mecanismos de “quorum sensing” (RUMJANEK et al. 2004) característicos de pseudomonas são atribuídas à capacidade de controle biológico e são consideradas como um modo indireto de promoção do crescimento vegetal.

2.2.1 Mecanismos diretos de promoção do crescimento de plantas por pseudomonas fluorescentes

Na ausência de fitopatógenos, bactérias fluorescentes do grupo pseudomonas apresentam mecanismos capazes de promover diretamente o crescimento de plantas. Entre estes, um dos mais estudados é a produção de auxinas que estimula o crescimento do sistema radicular das plantas inoculadas melhorando de forma geral a aquisição de água e nutrientes (SPAEPEN et al., 2007; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). Sob condições de estresses abióticos, a produção da enzima ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase) é também um mecanismo capaz de estimular o sistema radicular através da diminuição dos níveis de etileno nas raízes (GLICK et al., 2007). Outra característica das Pseudomonas fluorescentes associada à promoção direta do crescimento vegetal é a capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis através da produção de ácidos orgânicos e de fixação do nitrogênio atmosférico, tanto na forma livre, como quando associada à planta (SHIRAISHI et al., 2010). O estímulo no desenvolvimento do sistema radicular repercute no crescimento e desenvolvimento da planta, beneficiando a aceleração da taxa de germinação, a obtenção de mudas mais vigorosas, menos suscetíveis ao ataque de fitopatógenos habitantes

do solo e mais tolerantes a estresses ambientais, o incremento na área foliar, no conteúdo de clorofila, na absorção de nutrientes, no conteúdo de proteínas e na biomassa total contribui para a maior estabilidade no cultivo e produção (KRAISER et al., 2011).

2.2.2 Produção de auxinas

A biossíntese de auxinas, giberelinas e citocininas por bactérias fluorescentes do grupo pseudomonas pode mediar a promoção de crescimento de plantas em condições favoráveis ou sob estresses (EGAMBERDIEVA, 2009; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). De acordo com Glick et al. (2007) o estímulo ao crescimento decorrente da produção desses compostos por BPCPs é mais expressivo sob condições adversas. Uma série de estudos demonstra que durante o estresse salino, esses reguladores induzem tolerância incrementando a taxa de germinação de sementes, o crescimento e o estande de plântulas saudáveis (AFZAL et al. 2005; EGAMBERDIEVA, 2009; YAO et al., 2010). Dentre esses reguladores, a produção de auxinas por bactérias é o mais estudado, devido à importância desses compostos sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais como um todo, mas especialmente sobre o sistema radicular, através do estímulo ao surgimento de raízes laterais a partir de células do periciclo e raízes adventícias em órgãos excisados, que são úteis na propagação por estaquia de diversas espécies vegetais (MOCKAITIS & ESTELLE, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2009).

A produção de auxinas por pseudomonas fluorescentes estimula o surgimento de raízes secundárias que maximizam a exploração do solo e, conseqüentemente, favorecem a maior absorção de água e de nutrientes, principalmente o fósforo que depende de interceptação radicular para que seja absorvido (HODGE et al. 2009, PIMENTEL, C., 1998; YANG et al. 2008,).

Dentre as moléculas com atividade auxínica, a mais estudada é o ácido indol-3-acético (AIA) que tem como principal precursor o aminoácido aromático triptofano que participa de pelo menos cinco vias de biossíntese: indol-3-acetonitrila, indol-3-acetamida, indol-3-piruvato, triptamina e triptofano oxidase. Além dessas vias, supõe-se que o AIA possa ser sintetizado a partir do antranilato e numa via alternativa independente do triptofano, uma vez que AIA é produzido em baixas concentrações, em meios de cultivo sem a presença desse aminoácido (MOCKAITIS & ESTELLE, 2008; SPAEPEN et al., 2007).

As auxinas produzidas por pseudomonas interferem com o pool de auxinas da planta dependendo da quantidade produzida e da sensibilidade dos tecidos vegetais. Além disso, as auxinas têm efeito pleiotrópico, ou seja, uma mesma concentração pode estimular ou inibir o

crescimento e o desenvolvimento de um determinado órgão. Na planta, a raiz é um dos órgãos mais sensíveis a flutuações de AIA que promove desde o alongamento da raiz principal, a formação de raízes secundárias até a paralisação do crescimento (TAIZ & ZEIGER, 2009).

De acordo com Patten & Glick (1996) apud Spaepen et al. (2009) cerca de 80% das bactérias rizosféricas são capazes de produzir AIA, sendo que a existência de diferentes vias metabólicas e a diversidade de respostas, sugerem que esta molécula exerce um papel importante na interação entre bactérias e plantas. A produção de AIA está associada à patogênese por bactérias fitopatogênicas, com ou sem a formação de tumores. A síntese de grandes quantidades de AIA associada à presença de células sensíveis no tecido é capaz de induzir uma intensa multiplicação celular decorrente do desbalanceamento da relação auxina/citocinina e também pode aumentar a sensibilidade dos tecidos da planta a toxinas produzidas por bactérias fitopatogênicas (YAMADA, 1993). Bactérias fitopatogênicas podem produzir elevadas concentrações de AIA em meio de cultivo mesmo sem a adição de triptofano, conforme já foi demonstrado para *P. syringae* pv. *pisi* (YAMADA, 1993). O desenvolvimento de nódulos radiculares em leguminosas ocorre a partir da mudança nas taxas de auxina e citocinina nas células do córtex radicular devido à produção de inibidores do transporte e da ação das auxinas pelos rizóbios (TAIZ & ZEIGER, 2009). Para bactérias de vida livre que promovem o crescimento de plantas através da produção de AIA, o estímulo ao crescimento das raízes é vantajoso por aumentar os nichos de infecção e a exsudação radicular (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

Além do AIA, existem outras substâncias de origem natural que agem como auxinas. Isto é evidenciado pela diversidade de transportadores de membrana em raízes de plantas com diferentes níveis de especificidade para os ácidos 4-cloro-indol-3-acético, indol-3-butírico, indol-3-pirúvico e indol-3-acetonitrila que também podem ser produzidos por pseudomonas e são intermediários na via de síntese do AIA dependente de triptofano em plantas e microrganismos (MOCKAITIS & ESTELLE, 2008).

2.2.3 Solubilização de fosfatos insolúveis

O fósforo é um macronutriente essencial de ciclo aberto que não forma compostos estáveis na atmosfera. Nos solos, sua dinâmica é caracterizada por processos físico-químicos - sorção e dessorção e biológicos - imobilização e mineralização. O P orgânico compreende a fração desse elemento associado aos tecidos de plantas, animais e microrganismos que é hidrolisado por bactérias, fungos, actinomicetos e protozoários e mineralizado por

microrganismos heterotróficos que produzem enzimas como as fosfatases e as fitases que disponibilizam o P na solução do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em solução, o fósforo se liga a colóides permanecendo numa forma de baixa estabilidade (lábil) que pode passar para a forma não lábil quando forma complexos com o ferro, o cálcio e o alumínio. A maior parte do fósforo aplicado em fertilizantes é perdida devido a este processo, conhecido como fixação do P que limita a eficiência da fertilização em 10 a 25% e a concentração de P disponível no solo a 1 mg kg^{-1} , o que demanda a aplicação de quantidades superiores à necessidade das culturas representando um custo elevado para o produtor com a compra de fertilizantes e aumento da dependência de insumos externos na propriedade agrícola. Além disso, a lixiviação dos fertilizantes fosfatados solúveis é responsável pela eutrofização de lagos, represas e açudes (GYANESHWAR et al., 1999; RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; KHAN et al., 2009). Por isso, o uso de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade tem sido associado à degradação ambiental em função da baixa eficiência e do longo tempo de uso (ADESEMOYE & KLOEPPER, 2009). Reduzir o uso de fertilizantes minerais e melhorar a eficiência desses produtos é imperativo para manter a produtividade das culturas e reduzir o efeito negativo da atividade agrícola sobre o meio ambiente (ADESEMOYE & KLOEPPER, 2009). Uma possibilidade envolve a utilização de fontes de P de baixa solubilidade associadas à inoculação de bactérias que solubilizam fósforo (BSFs). De acordo com Khan et al. (2009), BSFs são amplamente distribuídas e uma elevada proporção pode ser obtida da rizosfera onde são metabolicamente mais ativas. Cerca de 40% da população de bactérias cultiváveis da rizosfera é capaz de solubilizar fósforo em cultura (SPAEPEN et al., 2009). Em diferentes solos, a proporção de BSFs pode ter relação com o conteúdo de matéria orgânica e de P (BARROTI & NARRAS, 2000). Bactérias fluorescentes do grupo pseudomonas são capazes de solubilizar fosfatos insolúveis devido ao efeito combinado da produção de ácidos orgânicos por redução do pH e quelação de cátions que competem com o fosfato pelos sítios de adsorção no solo (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). Esses compostos quelam os cátions ligados ao fosfato devido à presença dos grupamentos hidroxilas e carboxilas liberando o P complexado com o cálcio por redução no pH e, em complexos com ferro e alumínio, por complexação dos cátions e por dissolução como resultado da troca aniônica do fosfato pelo ânion do ácido (KHAN et al., 2009). Pseudomonas produzem diversos ácidos orgânicos, entre estes, o ácido glucônico é o principal quando se trata de solubilização de P. Em meio de cultivo a maior eficiência *in vitro* tem sido correlacionada ao tipo e à quantidade de ácidos excretados por essas bactérias, tais

como ácido glucônico, ácido oxálico, ácido cetoglucônico, ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido málico. *Pseudomonas* também produzem sideróforos de elevada afinidade que quelam o Fe^{+3} e liberam o P de complexos com esse elemento (PARK et al., 2009; VYAS & GULATI, 2009).

2.2.4 Outros mecanismos de promoção do crescimento de plantas sob estresse abiótico: atividade da ACC desaminase e biossíntese de exopolissacarídeos

Condições abióticas que limitam o crescimento e o desenvolvimento vegetal são resultantes de desequilíbrios ambientais de origem natural ou antrópica, tais como, o excesso ou a falta de água e minerais, presença de salinidade, metais pesados e contaminantes orgânicos. Sob tais condições, as plantas sintetizam pequenas moléculas conhecidas como espécies ativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete, hidroxilas livres e peróxidos, que comprometem a integridade das membranas celulares e levam à redução na taxa de fotossíntese líquida, encurtamento do ciclo vegetativo, modificações nas relações fonte / dreno e mudanças na composição da seiva floemática (PIMENTEL, 1999; IMLAY, 2008).

Evidências comprovam o potencial de *pseudomonas* fluorescentes em incrementar a produção de plantas sob condições favoráveis ou não ao crescimento, tendo sido observada correlação positiva entre a tolerância a estresses e o estabelecimento na rizosfera de populações desse grupo de bactérias (LUCY et al., 2004). Sob condições de estresse abiótico, a biossíntese de exopolissacarídeos e da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase) são mecanismos chave associados à promoção de crescimento de plantas (GLICK et al., 2007; SALEEM et al., 2007; MARULANDA et al., 2009; YANG et al., 2008).

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros higroscópicos que acumulam percentuais de água superior à própria massa. Os EPS podem reduzir a perda evaporativa de água mantendo as células hidratadas garantindo condições metabólicas adequadas durante períodos de estresse por seca e salinidade. EPS participam também da arquitetura dos biofilmes reconhecidos como uma estratégia capaz de aumentar as chances de estabelecimento de populações bacterianas quando inoculadas no solo e nas sementes (COSTERTON, 1995; CHANG et al., 2007; CZACZYK & MYSZKA, 2007).

Exopolissacarídeos presentes no material capsular de bactérias podem ser disponibilizados no solo onde são adsorvidos por argilas ou se ligam mediante pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e adsorção aniônica formando uma cápsula ao redor dos agregados do solo.

Nessas condições observa-se aumento no potencial de água ao redor das raízes, incremento na absorção de água e nutrientes e, por conseguinte, maior acúmulo de matéria seca pela planta (ALAMI et al. 2000; MILLER & WOOD, 1996).

Em condições de salinidade, EPS podem diminuir o conteúdo de sais disponíveis para as plantas, ligando-se a cátions como o Na^+ e dificultando sua absorção pelas raízes (GEDDIE & SUTHERLAND, 1993).

Pseudomonas produzem diferentes tipos de EPS: levan, marginalan, celulose e alginato, sendo a produção desses compostos induzida sob condições de estresse hídrico (KEITH et al., 1999; KACHLANY et al., 2001; CHANG et al. 2007). SANDHYA et al. (2009) demonstraram que a estirpe GAP-P45 de *P. putida* produz quantidades significativas de EPS que correlacionam positivamente com o incremento da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de girassol cultivadas sob condições de déficit hídrico.

Os estresses de origem biótica ou abiótica quase sempre induzem a síntese de etileno, que em plantas superiores, ocorre a partir do aminoácido sulfurado metionina (GLICK, 2005). A SAM sintetase catalisa a conversão da metionina a S-adenosil-L-metionina (SAM), que posteriormente é convertido, pela atividade da ACC sintase, em ácido-1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e 5-metil-tio-adenosina. Em seguida, a ACC oxidase catalisa a conversão do ACC a etileno, produzindo também dióxido de carbono e ácido cianídrico nesta etapa. O etileno produzido em condições de estresse é capaz de inibir o alongamento das raízes, nodulação e transporte de auxinas, além de induzir hipertrofias, senescência e abscisão de órgãos.

Pseudomonas fluorescentes produzem a enzima ACC desaminase (Acds) que catalisa a desaminação do ACC para produzir cetobutirato e amônia, ambos utilizados para o crescimento bacteriano, diminuindo dessa forma os níveis de etileno nos tecidos da planta (GLICK et al., 2007). Como consequência direta da atividade da Acds, observa-se aumento no crescimento da raiz e da parte aérea, acúmulo de biomassa e proteção das plantas contrapondo-se aos efeitos inibitórios do etileno já descritos. Os resultados sugerem que o decréscimo nos níveis endógenos de etileno torna a planta mais resistente aos estresses ambientais (GLICK, 2005; VANLOON & GLICK 2004).

Uma série de estudos relaciona a biossíntese de Acds por estirpes de *pseudomonas* à indução de tolerância nas plantas a salinidade, alagamento, seca e metais pesados (CHENG et

al., 2007; GAMALERO et al., 2009; KAUSAR et al., 2009). Os resultados obtidos por Gamalero et al. (2009) demonstraram que a estirpe UW4 de *P. putida*, Acds⁺, sob condições de estresse salino, promoveu o crescimento de pepino através do incremento do crescimento radicular, enquanto o mutante defeutivo, Acds⁻, não demonstrou capacidade semelhante. A co-inoculação da estirpe UW4 (Acds⁺) com um isolado do fungo micorrízico *Gigaspora rosea* sob estresse salino, favoreceu a promoção de crescimento do pepino na presença de estresse salino e houve promoção de crescimento superior àquela obtida com os microrganismos de forma isolada, além de estímulo à colonização micorrízica.

A estirpe UW4 (Acid⁺), tolerante a altos níveis de salinidade e baixa temperatura, foi capaz de se estabelecer na região rizosférica e de promover o crescimento de plantas de canola (CHENG et al., 2007). O efeito da inoculação das estirpes UW4, CAL2 de *Enterobacter cloacae*, *P. putida* (ATCC17399/pRKACC) e *P. putida* (ATCC17399/pRK415) sobre o crescimento de tomate em condições alagadas mostrou incrementos significativos sobre os parâmetros de crescimento das mudas com a inoculação das bactérias (GRICHKO & GLICK, 2000). Os autores sugeriram que a biossíntese de Acids pode estar relacionada às respostas observadas. Estirpes de *P. brassicacearum*, *P. marginalis*, *P. oryzihabitans*, *P. putida*, *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp., *Variovorax paradoxus*, *Bacillus pumilus*, e *Rhodococcus* foram tolerantes ao Cd⁺² e estimularam o crescimento de mudas de videira na presença de 300 M CdCl₂ em solução nutritiva (ARSHAD et al., 2007). Em outro estudo, Reed & Glick (2005) mostraram que uma estirpe bacteriana (Acids⁺) foi mais eficiente do que bactérias nativas, em promover o crescimento de plantas de canola crescendo em solo contaminado com cobre e creosoto.

De acordo com Saleem et al. (2007), a obtenção de plantas transgênicas mais tolerantes e produtivas em condições de seca, encharcamento e salinidade tem sido buscada por meio de transformação visando à expressão de genes *acdS*. No estudo conduzido por Rodriguez et al. (2008) plântulas transgênicas de canola transformadas com o gene *acdS* da estirpe UW4, foram expostas a altas concentrações de níquel e demonstraram incremento (50%) no percentual de emergência em relação às plantas não transformadas (25%). Ainda assim, quando comparadas às plantas não transgênicas inoculadas com outra estirpe de *P. putida*, HS-2, tolerante ao níquel, observou-se que as plantas não transformadas obtiveram 87,5% de emergência contra 62,5% das plantas transformadas e inoculadas. Nesse estudo, houve promoção de crescimento, a despeito da alta concentração de níquel registrada nas

raízes e na parte aérea das plântulas inoculadas com HS-2, sugerindo o potencial da inoculação para aumentar a performance das plantas a estresses abióticos.

2.3 Competência rizosférica e produção de sideróforos

O ferro, um dos mais importantes elementos utilizados para o crescimento microbiano, é requerido como co-fator na síntese de um expressivo número de enzimas e ferro-proteínas, além da clorofila, sendo essencial na manutenção da integridade dos cloroplastos (CHEN et al., 1998). É um dos elementos mais abundantes na Terra e poder-se-ia esperar que microrganismos não apresentassem problemas na sua aquisição. No entanto, desde que organismos fotossintetizantes enriqueceram a atmosfera terrestre com oxigênio, há dois bilhões de anos atrás, o ferro disponível tem sido progressivamente convertido na forma férrica a qual é insolúvel em água (LEWIN, 1984). A combinação de baixa disponibilidade biológica e elevada demanda de íons férricos na rizosfera determina uma forte competição entre microrganismos. O aparecimento de sideróforos para aquisição de ferro pelas células pode ser um mecanismo que levou à adaptação. Nessa competição, pseudomonas são eficientes em produzir sideróforos com alta e baixa afinidade causando uma depleção localizada de ferro e levando vantagem para se estabelecer na rizosfera. A produção de sideróforos é reconhecida como um mecanismo chave para a competência de pseudomonas em se estabelecer e se relaciona à elevada frequência dessas populações na rizosfera das plantas (LEMANCEAU et al., 2007).

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular (500–1000 Da) produzidos por fungos e bactérias, os quais quelam os íons Fe^{+3} para serem transportados para o interior das células (NEILANDS, 1989). Apesar do baixo peso molecular não atravessam as membranas celulares, são sintetizadas proteínas de membrana, transportadores, com alta e baixa afinidade.

Plantas contornam a depleção localizada de ferro, pois possuem estratégias para a aquisição de Fe em solos onde o elemento está indisponível e também requerem menores quantidades do que os microrganismos. Dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramineáceas reduzem quelados férricos concomitantemente à excreção de prótons e aumento da atividade de transportadores ferrosos na plasmalema das células radiculares. Monocotiledôneas gramineáceas, classificadas como Fe-eficientes, secretam fitossideróforos frente ao estresse por falta desse elemento (CURIE AND BRIAT 2003, HELL & STEPHAN, 2003).

Os sintomas visuais de nutrição inadequada de ferro em plantas são as cloroses intervenais de folhas jovens e o reduzido crescimento da raiz. Através da biossíntese de

sideróforos, pseudomonas podem incrementar a absorção de ferro em solos calcáreos, onde a disponibilidade desse elemento é insuficiente para o crescimento vegetal e estimular o crescimento de plantas devido ao aumento no suprimento de ferro (LUCON, 2000). Plantas podem adquirir o ferro a partir de sideróforos bacterianos e estimular o seu crescimento. Wei Jin et al.(2010) demonstraram que, mesmo em plantas Fe-eficiente como *Trifolium pratense*, as populações de bactérias que produzem sideróforos são mais abundantes quando as plantas estão crescendo em solos com baixa disponibilidade de ferro.

De acordo com os sítios ligantes específicos de Fe(III), os sideróforos contêm pelo menos um ácido hidroxâmico, um catecol e/ou um ácido α -hidroxicarboxílico que formam anéis quelatos de cinco membros muito estáveis com Fe(III) e relativamente estáveis com cobre(II), alumínio(III), cromo(III), gálio(III), molibdênio(II) e outros elementos transurânicos (BENITE & MACHADO, 2002). Todos os hidroxamatos possuem uma metade N-hidroxiornitina que tem moderada afinidade por Fe(III). Pseudomonas são capazes de produzir uma variedade de sideróforos fluorescentes e não fluorescentes, tais como ácido salicílico, pseudobactim, ferribactim, ferrosideróforos, ferricromo, ferroxamina B e pioquelim. Podem produzir hidroxamatos e catecolatos e ainda sideróforos mistos, tais como as pioverdinas que contêm hidroxamatos e catecolatos numa relação de 2:1 (BENITE & MACHADO, 2002).

Na competição por ferro com outros microrganismos, pseudomonas utilizam duas estratégias – produzir seus próprios sideróforos e usar sideróforos produzidos por fungos e bactérias devido à presença de receptores de alta e baixa afinidade que vão ser mais ou menos eficientes de acordo com o ambiente. Sistemas de baixa afinidade favorecem o uso de diversos sideróforos produzidos. Em contraste, se determinados tipos de sideróforos predominam em um habitat um reduzido número de receptores específicos pode ser suficiente para que a população de pseudomonas leve vantagem (LUCON, 2000).

Os estudos conduzidos por Lemanceau et al. (2007) mostraram que a produção de pioverdinas se relaciona com a competência rizosférica, pois pseudomonas obtidas da rizosfera são mais eficientes em produzir sideróforos com elevada afinidade para Fe(III) em comparação às de solo livre. Também foi demonstrado que um mutante defectivo da estirpe C7R12 de *P. fluorescens* para a produção de pioverdinas foi menos competitivo do que a estirpe selvagem quando foram inoculados em solo sem autoclavagem.

A produção de sideróforos é um mecanismo importante em bactérias para integrarem inoculantes para a promoção de crescimento de plantas porque sua produção pode ser vantajosa para estirpes introduzidas na rizosfera que precisam se estabelecer e defender esse nicho. A competência da estirpe em se estabelecer sobre as sementes e raízes é também um ponto fundamental quando se considera a eficiência das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Após a inoculação, a estirpe ou consórcio de estirpes, deve ser capaz de competir com a microbiota residente e de utilizar os metabólitos presentes na espermosfera e / ou na rizosfera para crescer e ativar vias de metabólitos secundários que vão interagir com a planta e com outros microrganismos, o que é definido como competência rizosférica (COOK, 2007; NELSON, 2004).

2.4. Regulação da produção de metabólitos em pseudomonas

Pseudomonas detêm potencial para produzir diversas substâncias que estão envolvidas com a promoção direta e indireta do crescimento de plantas. Dentre estes se destacam reguladores do crescimento vegetal, peptídeos, ácidos orgânicos, antibióticos, sideróforos e enzimas líticas (BERG et al., 2009; COMPANT et al. 2005; HAAS & DEFAGO 2005). A produção desses metabólitos por *pseudomonas* é regulada por fatores bióticos e abióticos, tais como a densidade celular, a composição e a quantidade de exsudatos de sementes e raízes, conteúdo de carbono, aminoácidos, metais pesados, elementos traço e toxinas.

2.4.1 Quorum sensing

A biossíntese de compostos antimicrobianos por *pseudomonas* está relacionada ao mecanismo de *quorum sensing* (QS) (MILLER & BASSLER, 2001). Através desse sistema, seres unicelulares possuem a habilidade de perceber o tamanho de sua população em determinado ambiente devido à produção de substâncias sinalizadoras, denominadas auto-indutores (CAMILLI & BASSLER, 2006).

A partir de uma determinada concentração limite de auto-indutores, estes sinais funcionam como co-indutores e passam a regular a transcrição de genes-alvo, o que garante vantagens para a população bacteriana, pela coordenação da expressão gênica conferindo às mesmas características de organismos multicelulares (ANDERSEN et al., 2003; RUMJANEK et al., 2004).

Em *pseudomonas*, o sistema QS está envolvido com a regulação da mobilidade, tolerância a estresses, transferência horizontal de genes, produção de surfactantes,

antibióticos, enzimas extracelulares e formação de biofilmes (VON BODMAN et al., 2003; DECHO et al., 2010).

Os biofilmes bacterianos são agregados multicelulares aderidos a um substrato biótico ou não, inseridos em matrizes poliméricas, que são geralmente associadas a mecanismos de QS e que permitem o acúmulo de autoindutores (DANHORN & FUQUA, 2007). Estas matrizes conectam as células e consistem basicamente de polissacarídeos extracelulares e podem conter DNA e proteínas (COSTERTON et al., 1999).

A formação de biofilmes protege a população bacteriana quando inoculada no solo e nas sementes e favorece a manutenção de uma densidade populacional para que se iniciem interações benéficas ou deletérias entre a planta e a bactéria (DANHORN & FUQUA, 2007).

O sistema QS envolve duas proteínas, uma receptora e uma homoserina lactona sintase que cataliza a síntese de lactonas homoserinas que são moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*. Em *Pseudomonas fluorescens* os principais sinalizadores são as acil-lactonas homoserinas (ALHs). Neste grupo bacteriano, a expressão dos genes de biossíntese de compostos antimicrobianos é regulada por sistemas proteicos compostos por dois componentes: uma proteína transmembrana que funciona como um sensor ambiental e uma proteína regulatória que media mudanças na expressão gênica em resposta ao sensor de sinais. Dentre esses sistemas destacam-se GacA/GacS, GrrA/GrrS, RpoD/ RpoS, GacA/RsmA (COMPANT et al., 2005; GE et al., 2007). Em *Pseudomonas* o sistema QS regula múltiplos genes envolvidos com a persistência no sistema radicular, tais como a produção de antibióticos, exoproteases, apresentação da superfície celular (LOH et al., 2002).

De acordo com Fuqua et al. (2001), a biossíntese e a secreção de antibióticos ocorrem geralmente depois que as bactérias entram na fase estacionária de crescimento, quando a densidade celular alcança determinado quorum que é percebido pelo acúmulo de ALHs.

A produção de sinalizadores por populações de *Pseudomonas* também estão relacionadas à competência rizosférica. No estudo conduzido por Wei & Zhang (2006) um mutante na estirpe 2P24 de *P. fluorescens* defectivo na produção de ALHs, não perdeu a capacidade de produzir antimicrobianos, mas não formou biofilme e não colonizou a rizosfera do trigo, perdendo a habilidade de antagonizar *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Yan et al. (2007) demonstraram correlação significativa entre a biossíntese de fenazina e pioluterina

em resposta ao acúmulo de dois sinalizadores: N-butilil-homoserina-lactona e N-hexanoil-homoserina em *Pseudomonas* sp. M18.

Plantas respondem a ALHs produzidos por bactérias. Já foi reportado que a espécie de leguminosa *Mendicago truncatula* é capaz de detectar e responder a ALHs produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Sinorhizobium melioli* pela mudança na expressão de genes ligados à síntese de flavonóides, resposta hormonal e metabolismo, proteínas regulatórias, degradação, síntese e citoesqueleto (BAUER et al., 2005).

Plantas e algas também podem produzir substâncias que mimetizam ALHs produzidos por bactérias. Algas produzem furanonas halogenadas que são semelhantes a ALHs produzidas por bactérias Gram-negativas (BAUER et al., 2005). Embora não esteja clara qual é a natureza das substâncias que mimetizam ALHs em plantas, sabe-se que interferem com o quorum sensing das populações bacterianas associadas à rizosfera, estimulando ou inibindo a expressão de genes que são regulados por sistema QS.

2.4.2 Exsudatos de sementes e raízes

Exsudatos de sementes e raízes são fatores chave para a estrutura e função da comunidade microbiana associada a estes órgãos. Ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, lipídeos, cumarinas, flavonóides, proteínas, enzimas, compostos alifáticos e aromáticos são exemplos de substâncias encontradas na interface solo-raiz (LYNCH, 1990; NELSON, 2004). Dentre esses, ácidos orgânicos são considerados as principais bases nutricionais e determinantes da colonização rizosférica (COOK, 2007), enquanto oligossacarídeos e aminoácidos são os principais compostos de baixo peso molecular disponível para os microrganismos (LUGTENBERG et al., 2002).

A quantidade e composição dos exsudatos são influenciadas por diversos fatores, tais como espécie e cultivar da planta, ciclo de vida, idade, nutrição, presença de microrganismos, solução do solo, temperatura, luminosidade e presença de metabólitos microbianos (ROVIRA, 1990).

Uma série de evidências relaciona a competência de rizobactérias em se estabelecer na região da espermosfera e da rizosfera e utilizar os exsudatos disponíveis, à expressão de genes ligados ao metabolismo de compostos com atividade antimicrobiana e à promoção de crescimento (COMPANT et al., 2010; KAMILOVA et al., 2006; LEMANCEAU et al., 2007). *Pseudomonas* fluorescentes são reconhecidas promotoras de crescimento de plantas

apresentando distribuição cosmopolita possivelmente relacionada a uma alta adaptabilidade genética e fisiológica (BATTLE et al., 2009).

De acordo com Loper & Gross (2007), no genoma da estirpe Pf-5 de *P. fluorescens*, há genes que conferem uma ampla capacidade metabólica, incluindo a utilização de uma variedade de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos presentes nos exsudatos de raízes e sementes. Pf-5 tem genes para o metabolismo de carboidratos derivados de plantas como maltose, sacarose, trealose e xilose, assim como para compostos mais complexos como vanilato, benzoatos e longas cadeias de ácidos graxos e hidrocarbonetos presentes em óleos de diferentes plantas. A capacidade de usar os compostos presentes no exsudatos radiculares associada à produção de sideróforos possivelmente se relaciona à competência das pseudomonas na rizosfera de diferentes espécies vegetais.

No estudo conduzido por Mazzola et al. (2004), avaliou-se a relação entre a população de pseudomonas capaz de produzir 2,4 –diacetil-fluoroglucinol (DAPG+) associada à rizosfera de cinco cultivares de trigo. Concluiu-se que exsudatos radiculares da cultivar Lewjain, incrementaram, significativamente, a população de pseudomonas DAPG+, em comparação com as demais cultivares avaliadas.

Fontes de carbono e aminoácidos presentes nos exsudatos radiculares exercem influência seletiva sobre o espectro de antibióticos produzidos por pseudomonas. Duffy & Défago (1999) relacionaram precursores presentes nos exsudatos de plantas com a biossíntese de antibióticos por pseudomonas. Neste estudo, observou-se que a produção de diacetilfluoroglucinol foi dependente de acetil-CoA, de pioluterina foi dependente de prolina, de ácido cianídrico de glicina, de triptofano para pirrolnitrina e de ácido corísmico para fenazina.

Strigul e Kravchenko (2006) avaliaram a contribuição de compostos orgânicos solúveis, do oxigênio molecular e do nitrogênio no solo na sobrevivência de pseudomonas artificialmente introduzidas na região rizosférica. Observou-se que a população microbiana oscila como resultado da periodicidade da exsudação radicular. A população de pseudomonas introduzida aumentou apenas durante o primeiro ciclo de exsudação, decrescendo, em seguida, em função da pronunciada competição por substratos orgânicos com os microrganismos residentes.

Percebe-se que fatores que influenciam a fisiologia das plantas, têm ação sobre a disponibilidade de compostos na rizosfera e, por conseguinte, sobre a comunidade microbiana associada. Uma série de estudos sobre regulação gênica de *Pseudomonas* mostra que genes envolvidos com o metabolismo de açúcares e aminoácidos são induzidos por exsudatos de raízes e sementes. Exsudatos de sementes de canola induzem a expressão de transportadores de açúcares em *P. putida* GR12-2R3. Demonstrou-se que exudatos de sementes de beterraba ativaram os sistemas regulatórios GacS/GacA envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (NELSON, 2004). Koch et al. (2002) demonstraram que a biossíntese de anfimisina por *Pseudomonas* sp. strain DSS73 é estimulada por exsudatos de sementes de beterraba dentro de 3 a 4 h após a semeadura em substrato previamente inoculado com *P. ultimum*.

No estudo realizado por Raaijmakers & Weller (2001), comparou-se a capacidade de utilização de 53 substratos orgânicos por *P. fluorescens* capazes de colonizar a rizosfera de trigo. A utilização de trealose, benzoato e valerato separaram as estirpes mais eficientes na colonização. Não obstante, De la fuente et al. (2007) avaliaram 55 estirpes de *P. fluorescens* (DAPG+) e não encontraram correlação entre a habilidade de utilizar estas três fontes de carbono e competência rizosférica em trigo e ervilha.

Em uma série de estudos, observou-se um aumento significativo na produção de AIA por *Pseudomonas* quando o meio de cultivo é suplementado com L-Trp e após as bactérias entrarem em fase estacionária de crescimento (GRAVEL et al., 2007; PEYVANDIA et al., 2010; KOCHAR et al., 2011) Se não for adicionado L-Trp ao meio de cultivo, ainda sim é possível detectar a produção de AIA por estas bactérias, porém em concentrações significativamente inferiores que possivelmente são sintetizadas a partir de uma via independente deste aminoácido (SPAEPEN et al., 2007).

Na rizosfera, a produção de auxinas por *Pseudomonas* também pode ser dependente da concentração de L-Trp presente nos exsudatos radiculares. Num estudo conduzido por Kamilova et al. (2009) observou-se que a inoculação da estirpe WCS365 de *Pseudomonas fluorescens* que é hábil em converter L-Trp em auxina *in vitro* não estimulou o crescimento de tomate, embora tenha estimulado o crescimento de rabanete que exsudou nove vezes mais L-Trp do que o tomate. Este resultado pode explicar em parte a ausência de promoção de crescimento quando se inocula *Pseudomonas* em diferentes espécies de plantas.

De acordo com Glick et al. (2007) existe uma ligação entre a síntese de ácido indol-acético e a produção de ACC nas plantas. No modelo proposto, o L-Trp estimula a síntese de AIA pelas bactérias associadas às raízes que em conjunto com o AIA presente nos tecidos da plantas induzem a multiplicação celular, o alongamento celular (crescimento ácido) e a transcrição da ACC sintase que cataliza a formação do ACC precursor do etileno. O ACC pode ser parcialmente excretado pelas raízes e usado como fonte de carbono e nitrogênio pelas bactérias que produzem ACC desaminase, convertendo-o em cetobutirato e amônia. Sabe-se que o etileno é um potente inibidor do crescimento das raízes. Este *loop* regulatório promove o crescimento da raiz pela produção de AIA ao passo que diminui a concentração de etileno o que impacta significativamente o crescimento e a multiplicação das raízes secundárias.

A produção do ácido glucônico, envolvido na solubilização de fosfatos insolúveis por pseudomonas, pode ser influenciada por ácidos orgânicos exsudatos pelas raízes. Com respeito a este mecanismo, Patel et al. (2011) investigaram a produção de ácido glucônico em *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que baixas concentrações de ácidos málico e succínico inibem reversivelmente a atividade da glicose desidrogenase, que é uma enzima chave para a síntese de ácido glucônico.

A rápida utilização de exsudatos de sementes e raízes pode garantir uma vantagem de bactérias antagonistas sobre microrganismos fitopatogênicos. Sementes são vulneráveis principalmente entre as primeiras 12–24 h após a germinação (NELSON, 2004), assim um agente de biocontrole que expresse mecanismos de antagonismo nesse curto intervalo é mais eficiente contra *R. solani* e outros fungos fitopatogênicos que atacam as plantas nos estádios iniciais do desenvolvimento.

É tecnicamente difícil obter um quadro detalhado da exata localização dos nutrientes na rizosfera e como estirpes de pseudomonas expressam genes de biossíntese de substâncias que promovem o crescimento de plantas em resposta à quantidade e qualidade desses nutrientes. A princípio, os microrganismos que crescem na superfície das raízes apresentam crescimento mais lento do que aqueles que crescem em meio de cultura no laboratório. No primeiro caso, há limitação de fatores de crescimento não incluídos, como nutrientes nos meios de cultura, além disso há que se considerar a intensa competição entre os microrganismos pelos nutrientes disponíveis na rizosfera (HAAS & KEEL, 2003). Em geral, condições que restringem o crescimento, assim como altas densidades celulares favorecem a produção de antibióticos e sideróforos, possivelmente como estratégia competitiva, enquanto

ótimas condições nutricionais tendem a ser exploradas para o metabolismo primário e a rápida multiplicação (MCARTHUR, 2006).

2.4.3 Toxinas

Toxinas produzidas por outros microrganismos presentes no solo, na esfermosfera e na rizosfera das plantas podem atuar negativamente sobre a produção de metabólitos com atividade antagonística e promoção de crescimento em pseudomonas. Algumas estirpes antagonísticas são insensíveis a estas toxinas graças à habilidade de desintoxicação. Outras não conseguem se desintoxicar e perdem a capacidade de promover o crescimento da planta hospedeira.

Estirpes de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia* e *P. aeruginosa* sensíveis ao ácido oxálico (AO) produzido por *R. solani* perdem a capacidade antagonística a esse fungo fitopatogênico. O AO atua inibindo a expressão de genes ligados à biossíntese de compostos antimicrobianos (DUFFY & DEFAGO, 1999). O ácido fusárico produzido por *F. oxysporum*, também tem efeito inibitório sobre a produção de DAPG por *P. fluorescens* (NOTZ et al., 2002).

Num programa de seleção de bactérias antagonistas podem-se buscar aquelas que demonstrem potencial para o antagonismo adicionado à insensibilidade aos fatores de virulência e que são estimuladas a produzirem antibióticos em resposta às toxinas produzidas pelo fitopatógeno alvo do biocontrole (NAGARAJKUMARA et al., 2005).

Demonstrou-se no estudo conduzido por JAMALI et al. (2009) que a expressão dos genes *phlA* e *hcnA* em pseudomonas, envolvidos na biossíntese de pioluterina e ácido cianídrico, respectivamente, foi estimulada pela presença de *R. solani* na rizosfera de feijoeiro.

De acordo com Nagarajkumara et al. (2005), a estirpe PfMDU2 de pseudomonas, isolada da rizosfera de arroz é capaz de crescer em meio líquido suplementado com 250mM de ácido oxálico, enquanto o isolado mais virulento de *R. solani* produziu em meio líquido 100 ug ml⁻¹ o que demonstra a capacidade desta estirpe em se desintoxicar.

2.4.4 Fatores abióticos

As condições de crescimento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes exercem influência sobre a produção de metabólitos secundários. A qualidade e disponibilidade de minerais, tensão de oxigênio, gradiente osmótico, conteúdo de fosfato, sulfato e fontes de nitrogênio e

carbono são os principais fatores envolvidos em meio de cultivo (STRIGUL & KRAVCHENKO, 2006).

As fontes de carbono influenciam a atividade de microrganismos patogênicos, contribuem para a variabilidade do biocontrole em diferentes solos e sobre o hospedeiro que difere quanto à composição dos exsudatos de sementes e raízes e ainda influenciam a biossíntese de antibióticos em estirpes de biocontrole. Essa compreensão pode facilitar a modulação da biossíntese de antimicrobianos. Determinadas condições podem favorecer a biossíntese de um metabólito em detrimento de outro. Assim podem ocorrer variações no mecanismo de antagonismo, ou na produção de um determinado metabólito em função do meio disponível. A biossíntese de DAPG por *P.fluorescens* CHA0 é estimulada na presença de glicose como fonte de carbono, enquanto a biossíntese de pioluterina é reprimida. Este mecanismo assegura um grau de flexibilidade para o antagonista em face das mudanças no ambiente (DUFFY & DÉFAGO, 1999).

Nos estudos conduzidos por Meyer & Abdallah (1978) e Rachid & Ahmed (2005), consignou-se que o succinato incrementa a biossíntese de pioverdinas por *P. fluorescens*.

Alguns metabólitos podem ser sintetizados por mecanismos constitutivos ou induzidos. Nielsen & Sorensen (1998) demonstraram que a biossíntese de quitinases por pseudomonas ocorre em meio em Batata dextrose ágar ou Triptona de soja, com ou sem adição de quitina exógena. Concluindo-se que a presença de quitina não é necessária num meio de crescimento para indução dessas enzimas.

Os aminoácidos glicina, serina e treonina são substratos para a biossíntese de ácido cianídrico que em pH fisiológico pode ser volatilizado (LYNCH, 1990).

A produção de ácido glucônico envolvido na solubilização de fosfatos insolúveis por pseudomonas a partir da glicose é um mecanismo constitutivo e geralmente ocorre em grandes quantidades na presença de glicose, independentemente da concentração de P no meio de cultura. *Pseudomonas fluorescens* convertem a maioria da glicose extracelular em gluconato e 2-cetogluconato (FUHRER et al., 2005). Elevada produção de ácido está relacionada a uma elevada taxa de crescimento e altas concentrações de glicose no meio de cultura (PARK et al., 2009).

De acordo com Spaepen et al. (2007) a produção de AIA por diversas bactérias é influenciada por estresses abióticos tais como pH, potencial osmótico e limitação de carbono.

A limitação de disponibilidade de carbono e a conseqüente redução na taxa de crescimento com a entrada na fase estacionária ligados a densidade populacional aumentam a biossíntese de AIA.

2.4.5 Metais pesados e elementos traço

Elementos traço, como o zinco, cobalto e molibdênio influenciam a estabilidade genética de pseudomonas afetando sua capacidade de produzir metabólitos secundários. No estudo desenvolvido por DUFFY & DEFAGO (1999), objetivou-se identificar minerais e fontes de carbono que influenciam diferencialmente a biossíntese dos antibióticos DAPG, Plt e Prn, e dos sideróforos ácido salicílico e pioquelim pela estirpe CHA0 de *Pseudomonas fluorescens*. Observou-se que a biossíntese de DAPG, assim como do seu precursor mono-acetil-fluoroglucinol foi estimulada por zinco, molibdato de amônia e glicose. A biossíntese de Plt foi estimulada por zinco, cobalto e glicerol e, reprimida por glicose. Prn foi estimulada por frutose, manitol e por uma mistura de zinco com molibdato de amônio. A biossíntese de pioquelim foi incrementada com cobalto, frutose, manitol e glicose, enquanto a biossíntese do seu precursor - ácido salicílico foi estimulada por molibdato de amônio, glicerol e glicose. De forma geral, a adição de fosfato inorgânico reprime a biossíntese dos antibióticos avaliados. Alguns fatores podem ter efeito geral ou ser estirpe dependente, pois os resultados obtidos com a estirpe CHA0 não foram idênticos para outras 41 estirpes identificadas como *P. fluorescens* e avaliadas no presente estudo. Não foi generalizado, por exemplo, o estímulo à biossíntese de Phl por zinco. Ao contrário, a biossíntese de pioluterina pode ser estimulada por zinco e reprimida por glicose para todas as estirpes avaliadas.

ONGENA et al. (2008) investigaram a modulação fisiológica e ambiental da biossíntese de benzilamina pela estirpe BTP1 de *P. putida* envolvida na indução de resistência sistêmica nas plantas hospedeiras. A biossíntese é relacionada ao metabolismo secundário e ao contrário de outros compostos é mais eficiente em baixa taxa de crescimento. Demonstrou-se que a presença de aminoácidos livres como fenilalanina, além de zinco, molibdênio, magnésio e cobalto não influenciaram a biossíntese de benzilamina. O ferro que influencia positivamente a biossíntese de HCN e Phn inibiu a biossíntese desse composto pela estirpe BTP1.

A biossíntese de sideróforos por pseudomonas é positivamente regulada pela baixa disponibilidade de ferro no meio de cultivo. Sob condições aeradas, pH neutro a alcalino, o ferro está usualmente na forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ e a constante de solubilidade é de $10^{-38,7}$, por isso

a concentração de ferro solúvel fica abaixo do ótimo para o crescimento bacteriano (LINDSAY & SCHWAB, 1982; SCHWYN & NEILANDS, 1986).

Meyer e Abdallah (1978) investigaram a biossíntese e as propriedades físico-químicas das pioverdinas frente a diferentes fontes de carbono e concentrações de ferro. Concluiu-se que, qualquer substrato orgânico poderia, a princípio, suportar a produção de pioverdina, mas o nível absoluto de Fe(III) no qual o crescimento microbiano começa a ficar limitado varia com a natureza do substrato. A adição de 100 uM de Fe(III) no meio de cultivo levou a incremento de 1,5 vezes no crescimento de *P. fluorescens* e redução em 7 vezes na biossíntese de sideróforos (MEYER et al., 2008).

Nesta linha, Rachid e Ahmed (2005) avaliaram a biossíntese de pioverdinas por cinco estirpes de *P. fluorescens* na presença de Fe(III), presença de metais pesados como mercúrio, cádmio e chumbo e antibióticos penicilina e estreptomicina. Concluiu-se que o aumento da concentração de ferro foi inversamente proporcional à sua biossíntese. A estreptomicina reduziu a biossíntese de pioverdinas enquanto a penicilina a incrementou mesmo sob alta concentração de ferro no meio de cultivo. O mercúrio e o cádmio interferiram negativamente sob a biossíntese de pioverdinas, principalmente sob limitação de ferro, enquanto o chumbo incrementou a biossíntese sob excesso de ferro.

A produção de sideróforos também é estimulada sob elevadas concentrações de metais pesados. Sideróforos promovem a síntese de AIA por bactérias que é inibida nessas condições (RAJKUMAR et al., 2010). No estudo realizado por Chaiharn et al. (2009) avaliou-se o efeito da temperatura e tempo de incubação sobre a biossíntese de hidroxamatos por *Pseudomonas aureofaciens* AR1. Concluiu-se que a máxima produção se dá após 15 dias de incubação a 30 °C. Entre estirpes da mesma espécie ocorrem consideráveis variações, pois a biossíntese de sideróforos por AR1 é muito mais lenta do que GRC2 que atinge a máxima produção após 48 h de incubação nas mesmas condições.

3 OBJETIVO GERAL

Selecionar e caracterizar bactérias fluorescentes quanto ao potencial para a promoção do crescimento de hortaliças.

3.1 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias do grupo fluorescente das pseudomonas a partir do solo pós-cultivo de hortaliças e caracterizá-las quanto ao perfil bioquímico;
- caracterizar bactérias fluorescentes obtidas do solo rizosférico e pós-cultivo de hortaliças, quanto à capacidade de formar biofilmes, produzir sideróforos, acil-lactonas homoserinas, ácido indol-3-acético e solubilizar fosfato de cálcio insolúvel;
- avaliar o potencial de bactérias fluorescentes para promover o crescimento de plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) sob condições de casa-de-vegetação;
- avaliar o efeito da inoculação do consórcio de três bactérias do grupo fluorescente das pseudomonas e de duas rizobactérias e duas estirpes de rizóbio sobre o crescimento de plantas de couve;
- comparar o efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes à aplicação do ácido indol-3-acético sintético sobre o crescimento de plântulas de couve.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e caracterização dos isolados

O estudo foi realizado a partir de 189 isolados obtidos de áreas de cultivo de hortaliças localizadas na Fazendinha Agroecológica Km 47. Os isolados de rizosfera já haviam sido obtidos anteriormente durante os experimentos de dissertação de mestrado (DIAS, 2008). O presente estudo compreende, portanto a caracterização dos isolados de rizosfera, bem como o isolamento e caracterização de pseudomonas de solo não associado, conforme será descrito.

4.1.1 Isolados de rizosfera

Um total de 119 isolados obtido da rizosfera de hortaliças cultivadas na Fazendinha Agroecológica Km 47, dos quais 16 foram isolados de alface (*Lactuca sativa*), 48 de couve-de-folha (*Brassica oleracea* cv. *acephala*), 26 de rúcula (*Eruca sativa*) e 29 de salsa (DIAS, 2008). Destes, 113 foram identificados pelo sistema API 20NE (Analytab Profile Index, BioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, MO). Noventa e quatro isolados apresentaram perfil bioquímico idêntico às espécies *P. putida* e *P. fluorescens* (22 *P. fluorescens* e 94 *P. putida*). Dos demais, um isolado mostrou perfil bioquímico de *Burkholderia cepacia*, três de *Aeromonas salmonicida*, um de *Methylobacterium mesophilicum*, um de *Rhizobium radiobacter*, quatro de *Stenotrophomonas maltophilia* e nove como *Pseudomonas luteola* (Dias, 2008).

4.1.2 Isolados de solo

Os isolados foram obtidos a partir de solo de canteiro após o cultivo de couve-de-folha, alface, salsa, rúcula e cebolinha (*Allium fistulosum*) na Gleba X da Fazendinha Agroecológica Km 47. Foram obtidas amostras de solo compostas a partir de três tradagens (0-20 cm de profundidade) em um canteiro de cada uma das hortaliças. Retirou-se uma alíquota de 10 g, transferiu-se para 100 ml de solução de cloreto de sódio (0,085% m v⁻¹) e agitou-se por 30 minutos a 200 rpm. A partir dessa suspensão, foram preparadas diluições seriadas até 10⁻⁶, retirou-se 100 µl e espalhou-se na superfície de placas de Petri contendo o meio King B (King et al., 1954) adicionado de ampicilina (50 µg ml⁻¹), cloranfenicol (12,5 µg ml⁻¹) e cicloheximida (100 µg ml⁻¹). Todas as diluições foram plaqueadas em triplicata e incubadas a 29 °C por 48 h. As colônias que fluoresceram sob luz UV (STANIER et al., 1966) foram armazenadas em microtubos contendo King B líquido com 50 % de glicerol a -20 °C e a -80 °C.

4.2 Caracterização dos isolados

4.2.1 Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica dos isolados de solo foi realizada de acordo como o sistema API 20NE (Analytab Profile Index, BioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, MO). Os testes seguiram o protocolo descrito pelo fabricante constando de incubação por 24 e 48 h a 29 °C após inoculação das isolados. As leituras foram realizadas após 48 h, com exceção dos testes referentes aos substratos: nitrato de potássio, triptofano e glicose, cujas leituras foram efetuadas após 24 h.

4.2.2 Detecção da produção de biofilmes

Uma colônia de cada isolado crescido em meio King B (29 °C, 24 h) foi transferida para tubos de ensaio de vidro contendo 3 ml de meio King B líquido. Incubou-se a 29 °C por 48 h sob agitação constante (150 rpm). A formação de biofilme foi observada a olho nu nas paredes do tubo de ensaio.

4.2.3 Produção de sideróforos

Os isolados foram crescidos em placas de 96 poços contendo 150 µl de meio King B sólido (29°C/ 24 h). A testemunha consistiu de poços contendo meio sem inoculação. Adicionou-se sobre o crescimento 150 µl de meio Ágar Cromo Azurol S (CAS) contendo cromo azurol, 60,5 mg, hexadeciltrimetil brometo de amônio (HDTMA), 72,9 mg, piperazina-1,4-bis (2-ethano ácido sulfônico) (PIPES), 30,24 g, FeCl₃·6H₂O 1 mM dissolvido em 10 mL de HCl (10 mM) e agarose 0,9% m v⁻¹ (SCHWYN & NEILANDS, 1987; PÉREZ-MIRANDA et al., 2007). Foram asseguradas três repetições. Após 1 h, os sideróforos produzidos pelos isolados positivos em meio KB se difundiram para o meio CAS e complexaram o ferro presente alterando a cor do meio de azul para roxo, laranja, verde ou amarelo.

4.2.4 Detecção da produção de ALHs

Foi utilizada a estirpe repórter NT1 de *Agrobacterium tumefaciens*, cuja produção de ALHs é bloqueada por mutação, mas que possui o gene *lacZ* (β-galactosidase), o qual é ativado em presença de ALHs exógenas. Uma pré-cultura dessa estirpe, crescida em meio TY líquido (BERINGER, 1974), foi diluída 40x no meio TY derretido contendo 0,75% de agar e 40 µg ml⁻¹ do substrato indicador da β-galactosidase (X-Gal, Invitrogen) antes da

solidificação (~42°C). Este meio de cultura foi colocado em placas contendo seis poços. Uma colônia de cada isolado crescido em meio King B (29 °C, 24 h) foi transferida para o meio com a estirpe repórter de *A. tumefaciens*. O sistema foi incubado em estufa a 29°C durante 24 h. Ao entrar em contato com um isolado produtor de ALHs, foi observada a hidrólise do X-Gal através da coloração azul do indicador (VAN HOUDT et al., 2004).

4.2.5 Produção de ácido indol-acético e compostos indólicos

Inoculou-se 500 µl de suspensão bacteriana (10^9 UFC ml⁻¹ em NaCl 0.85% m v⁻¹) em 5 ml de meio Triptona de soja líquido adicionado de 200 µg ml⁻¹ de L-triptofano (Sigma-Aldrich). Incubou-se por 72 horas a 28 °C sob agitação constante de 150 rpm no escuro. A densidade óptica após as 72 horas foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda para determinar o crescimento da cultura. Centrifugou-se (10.000 rpm, 5 min), descartou-se o precipitado e adicionou-se 1 ml do reagente de Salkowski (SALKOWSKI, 1885 apud GLICKMANN & DESSAUX, 1995) a 1,5 ml do sobrenadante. Incubou-se por 30 min no escuro e foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro ($\lambda=540$ nm). A concentração de AIA e compostos relacionados foi calculada usando uma curva preparada a partir de uma solução concentrada de 100 mg de ácido indol-acético (Sigma-Aldrich) em 100 ml de água destilada e metanol (50% v v⁻¹). Foram feitas três repetições. As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A **Tabela 1** mostra o volume utilizado de uma solução conhecida de AIA sintético (1mg ml⁻¹) para produção das soluções com concentrações crescentes (25 a 400 µg ml⁻¹) a um volume de 10 ml que foram utilizadas na construção de curva-padrão obtida a partir da leitura de absorbância ($\lambda=540$ nm) A **Figura 1** mostra a curva-padrão obtida com os dados da Tabela 3, a equação da reta e o ajuste linear do modelo que obteve um alto coeficiente de determinação ($R^2=0,9975$) e que foi usado para calcular a concentração de AIA e compostos indólicos relacionados nos sobrenadantes bacterianos).

Tabela 1. Medida de absorvância no comprimento de onda de 540 nm de soluções de AIA sintético produzidas a partir de uma solução a 1 mg.ml⁻¹

AIA 1mg ml ⁻¹ (μ l)	Volume final da solução (ml)	Concentração de AIA (μ g ml ⁻¹)	Absorvância (λ =540 nm)
25	10	25	0,058
50	10	50	0,144
100	10	100	0,302
200	10	200	0,548
300	10	300	0,793
400	10	400	1,030

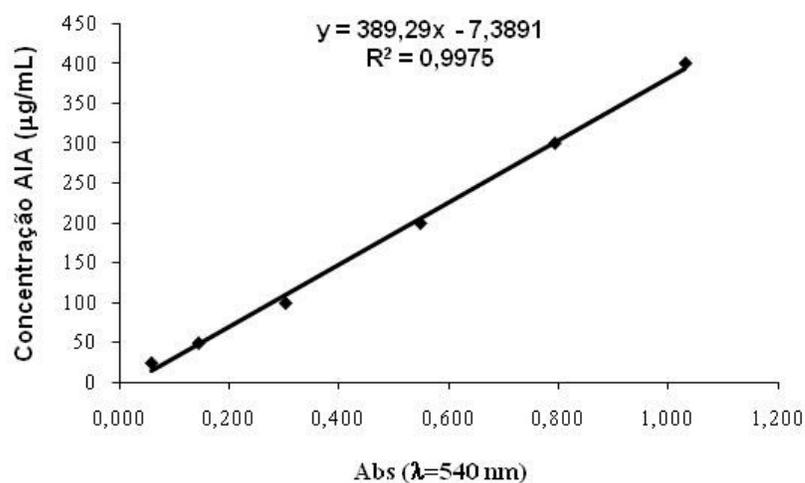


Figura 1. Curva-padrão relacionado a absorvância (λ =540 nm) e a concentração de AIA sintético

De acordo com as concentrações produzidas os isolados foram distribuídos em cinco classes artificiais: (I) isolados que não produziram AIA; (II) isolados que produziram até 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (III) isolados que produziram mais do que 10 até 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (IV) isolados que produziram mais do que 25 até 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e (V) isolados que produziram mais de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

4.2.6 Solubilização de fosfato de cálcio insolúvel

Retiraram-se alíquotas de 5 μl de uma suspensão bacteriana (10^9 UFC ml^{-1} em NaCl 0.85%) que foram distribuídas em três pontos equidistantes de duas placas de Petri com 20 mL de meio GL (glicose, extrato de levedura e ágar) contendo CaHPO_4 insolúvel pela adição de 100 mL de CaCl_2 e 50 mL de K_2HPO_4 a um litro de meio. Ao meio de cultura, adicionou-se o corante púrpura de cresol (0,1 g l^{-1}) e ajustou-se o pH para 7. Foram realizadas avaliações aos 3, 6, 9 e doze dias de crescimento a 29 °C e consideraram-se positivos os isolados que exibiram halo ao redor das colônias. Foi aferido o diâmetro do crescimento da colônia e do halo de solubilização, a partir dos quais calcularam-se o Índice de Solubilização (IS) através da fórmula: $\text{IS} = \frac{\text{diâmetro do halo solubilização (mm)}}{\text{diâmetro colônia (mm)}}$ (BERRAQUERO et al., 1976). De acordo com o IS após doze dias de crescimento, determinou-se a Eficiência de Solubilização (ES) dos isolados em baixa ($\text{IS} < 2$), média ($2 \leq \text{IS} < 3$) e alta ($\text{IS} \geq 3$) (Modificado de HARA & OLIVEIRA, 2004). As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

4.3 Promoção de crescimento

4.3.1 Caracterização dos isolados

Foram avaliados 94 isolados (83 de rizosfera e 11 de solo pós-cultivo) previamente caracterizados pelo sistema API 20NE. Dentre os isolados de rizosfera avaliados, 61 apresentaram perfis bioquímicos idênticos ao de *P. putida*, 17 de *P. fluorescens*, três de *S. maltophilia*, um de *P. luteola* e um de *M. mesophilicum*. Dentre os isolados de solo, dez apresentaram perfis bioquímicos idênticos ao de *P. putida* e um de *P. luteola*.

4.3.2 Avaliação da inoculação de isolados de rizobactérias fluorescentes na promoção de crescimento da couve

Foram conduzidos oito ensaios, no período compreendido entre os meses de abril a novembro dos anos de 2009 e 2010. Um volume padronizado (1 ml) de suspensão bacteriana (10^9 UFC ml^{-1} em NaCl 0.85% m v^{-1}) foi inoculado junto às raízes das mudas de couve

Manteiga da Geórgia (ISLA, Brasil) (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 10 dias após a semeadura (DAS), em vasos contendo 1 kg de terra não autoclavada, do horizonte A de um Planossolo, com os seguintes atributos químicos: pH, 5,3, Al, 0,3 cmolc dm⁻³, Ca + Mg, 0,9 cmolc dm⁻³, P, 4 mg dm⁻³, K, 20 mg dm⁻³, carbono, 0,33% e matéria orgânica, 0,57%. A testemunha recebeu o mesmo volume de água destilada e autoclavada. Aos 15 DAS, foram adicionados 6 ml por vaso de uma solução nutritiva contendo: NH₄NO₃, 2,8 g; K₂HPO₄, 3,5 g; CaCl₂.2H₂O, 15 g; MnSO₄.H₂O, 0,50 g por litro. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e irrigados com 50 ml de água destilada duas vezes ao dia. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com cinco repetições. A coleta das plantas foi realizada aos 40 DAS, e os parâmetros avaliados foram massa de matéria fresca e seca da parte aérea, massa de matéria seca das raízes e massa de matéria seca total. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.3 Avaliação da inoculação de consórcio de rizobactérias na promoção de crescimento da couve

Foi realizado um ensaio visando avaliar o efeito da co-inoculação de três isolados caracterizados como *P. putida* simultaneamente na promoção de crescimento de couve Manteiga da Geórgia. As suspensões bacterianas foram preparadas isoladamente conforme descrito no item anterior e retiradas alíquotas iguais para a composição das suspensões no momento da inoculação, mantendo-se a concentração final de células em cerca de 10⁹ UFC ml⁻¹. Os seguintes tratamentos foram utilizados:

- I. C183
- II. C227
- III. C337
- IV. C183+C227
- V. C183+C337
- VI. C227+C337
- VII. C183+C227+C337
- VIII. Testemunha

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e adotaram-se as mesmas condições, época de coleta e analisaram-se as variáveis descritas no item anterior. Os dados obtidos foram

submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.3.4 Avaliação da inoculação de consórcio de rizobactérias e estirpes de rizóbio eficientes para a inoculação de feijão caupi na promoção de crescimento de couve

Foi avaliada também a co-inoculação de dois isolados obtidos da rizosfera de rúcula (R1132) e salsa (S3103) com duas estirpes de rizóbio: BR3267 e BR3299 selecionadas previamente para o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (MARTINS, 1996; RUMJANEK et al., 2005). Utilizaram-se sementes de couve Manteiga Híbrida Hi-Crop (Takii, Japão). Para o preparo das suspensões dos rizóbios, estes foram crescidos em meio TY líquido por 96 h a 29 °C sob agitação (150 rpm) e inoculados utilizando 1 ml dessa suspensão. A co-inoculação foi realizada conforme descrita no ensaio anterior. Os tratamentos utilizados foram:

- I. R1132
- II. S3103
- III. BR3267
- IV. BR3299
- V. R1132+S3103
- VI. R1132+BR3267
- VII. R1132+BR3299
- VIII. S3103+BR3267
- IX. S3103+BR3299
- X. BR3267+ BR3299
- XI. R1132+S3103+ BR3267
- XII. R1132+S3103+ BR3299
- XIII. R1132+ BR3267+ BR3299
- XIV. S3103+ BR3267+ BR3299
- XV. R1132+S3103+BR3267+BR3299
- XVI. Testemunha

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e adotaram-se as mesmas condições, descritas no item anterior. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4 Avaliação do efeito da concentração de AIA na promoção de crescimento em mudas de couve

Foi realizado um ensaio para comparar o efeito de rizobactérias com o efeito do AIA na promoção de crescimento de couve Manteiga Híbrida Hi-Crop. O ensaio foi composto por cinco blocos ao acaso com 13 tratamentos: inoculação com seis rizobactérias (C142, R223, R1132, C227, C3113 e S311), aplicação de seis concentrações de AIA sintético, correspondentes à produção dos isolados bacterianos: 2,73; 10,9; 61,51; 82,9; 87,2 e 128,27 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente e uma testemunha. Os isolados bacterianos testados foram selecionados em função da produção de diferentes níveis de AIA e compostos relacionados *in vitro*. Todos apresentaram perfil bioquímico idêntico a *P. putida* e três deles promoveram o crescimento de couve. Para o preparo do inóculo bacteriano, inoculou-se 3 ml de suspensão bacteriana (10^9 UFC ml^{-1} em NaCl 0,85% m v^{-1}) em 200 ml de meio Triptona de soja líquido adicionado de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de L-triptofano (Sigma). Incubou-se por 72 horas a 28 °C sob agitação constante de 150 rpm no escuro. Foi feita a leitura da densidade óptica da turbidez do meio ($\lambda=600$ nm). Centrifugou-se (10.000 rpm, 5 min), descartou-se o precipitado e adicionou-se 1 ml do reagente de Salkowski a 1,5 ml do sobrenadante. Após incubação por 30 min no escuro foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro ($\lambda= 540$ nm). A concentração de AIA e compostos relacionados foi calculada com uma curva preparada a partir de uma solução concentrada de ácido indol-3-acético conforme descrito no item 2.2.4. Um volume padronizado (1 ml) de suspensão bacteriana crescida em meio TS foi pipetado junto às raízes de plântulas de couve, 7 dias após a semeadura (DAS), em vasos contendo 1 kg de terra não autoclavada, do horizonte A de um Planossolo misturado com areia lavada na proporção de 2:1. A testemunha recebeu o mesmo volume de meio TS suplementado com L-TRP. As soluções de AIA foram preparadas a partir de uma solução concentrada de 1 mg ml^{-1} de ácido indol-3-acético (Sigma) diluído em água e metanol (50% v v^{-1}) e aplicou-se 1 ml por plântula. Aos 15 DAS, foram adicionados 6 ml por vaso de uma solução nutritiva descrita no item 2.3.2. Foram feitas cinco repetições. A coleta das plantas foi realizada aos 25 DAS e as variáveis analisadas foram: massa de matéria fresca e seca da parte aérea, das raízes e total, área foliar, área radicular, comprimento da raiz principal e número de raízes secundárias numa sessão de 4 cm medida a partir da base da raiz principal. As médias das plantas inoculadas com as suspensões bacterianas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias das plantas inoculadas com as bactérias e o AIA foram comparadas duas a duas pelo teste t de Student.

4.5 Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rRNA

Foi seguido o protocolo descrito por Schwieger & Tebbe (1998) modificado por Xavier et al. (2004). Uma suspensão de células foi centrifugada (9.000 rcf, 10 min) e o precipitado foi ressuspendido em 0,6 ml de tampão TES (0,05 M NaCl; 0,01 M EDTA; 0,05 M Tris HCL pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, foram efetuadas 5 etapas de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido (5 min), agitação (180 rpm; 10 seg) e aquecimento (65 °C; 5 min). Proteinase K (8,4 µL; 20 µg mL⁻¹) foi adicionada à amostra, procedendo-se à incubação sob agitação (180 rpm; 65 °C; 1h). Em seguida, foi adicionado 0,6 ml (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e, novamente uma centrifugação (5.000 rcf; 6 min). O sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionando-se 0,6 ml (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico e repetindo-se a centrifugação nas condições anteriores. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml do sobrenadante foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 0,5 volume de isopropanol gelado. A amostra foi incubada (60 min; -20 °C), centrifugada (13.000 rpm; 20 min) e após remoção do sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM NA-EDTA; pH 8,0). O gene 16S rRNA dos isolados foi amplificado usando os “primers” universais 27F e 1492R (HEUER et al., 1997) com uma temperatura inicial de desnaturação de 95 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. A mistura da reação contém tampão 1x, MgCl₂, 1,5 mM, dNTP, 200 µM, 0,2 µM de cada primer e 2.5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brazil) e 20 ng de DNA molde num volume final de 50 µl.

4.6 Sequenciamento do gene 16S RNAr

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os primers 22F e 518F/1492R-800R em sequenciador automático ABI 3730, com auxílio do Kit BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems, USA). Os contigs foram montados com auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler. As seqüências foram então comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) e alinhadas usando o programa Mega 3.1, método Neighbor-Joining e o modelo de Kimura 2-parameter com 5000 valores de bootstrap.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e caracterização de bactérias fluorescentes de solo pós-cultivo de hortaliças

Setenta isolados foram obtidos a partir dos solos de canteiros pós-cultivo de alface (13), couve (16), rúcula (27), salsa (7) e cebolinha (7). Esses isolados foram caracterizados bioquimicamente utilizando o sistema API 20NE que foi desenvolvido para caracterizar bactérias Gram-negativas não entéricas presentes em amostras clínicas. Foi gerado um perfil bioquímico de cada isolado com os resultados de 20 reações bioquímicas diferentes (**Anexo A**). O conjunto de isolados foi dividido em seis grupos com perfil idêntico à *P. putida* (33 isolados), *Acinetobacter baumannii* (14 isolados), *Burkholderia cepacia* (três isolados), *P. luteola* (três isolados), *Stenotrophomonas maltophilia* (dois isolados) e perfil inconclusivo (15 isolados).

No Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *Pseudomonas* são descritas como bacilos retos ou ligeiramente curvos, aeróbias, móveis por meio de um ou mais flagelos polares, Gram-negativas que não formam esporos. Apresentam reações positivas para catalase e oxidase. Todas as espécies usam oxigênio molecular como aceptor final de elétrons e algumas espécies podem usar nitrato como aceptor alternativo. São quimiorganotróficas, ou seja, retiram a energia de reações de oxidação e redução de compostos orgânicos e utilizam o carbono presente em compostos orgânicos (PALLERONI, 2005). Algumas espécies, como *Pseudomonas carbohydrogenera* podem ser quimiolitotróficas facultativas, pois podem utilizar monóxido de carbono como fonte de carbono inorgânico (TORTORA, 2009). São generalistas, isto é usam um conjunto de fontes de carbono com eficiência similar e são encontradas em diferentes habitats. De acordo com McArthur (2006) estirpes de *P. putida* são capazes de usar 77 compostos diferentes de carbono.

No presente estudo, os isolados que apresentaram perfil idêntico aos do gênero *Pseudomonas* apresentaram reação negativa para degradação do triptofano, fermentação anaeróbica da glicose e utilização do manitol. Elevada frequência de isolados usaram arabinose, caprato, adipato, malato, citrato, ácido fenilacético e gluconato de potássio para o crescimento (**Tabela 2**).

Tabela 2. Frequência de isolados de solo pós-cultivo de hortaliças positivos para as reações do sistema API 20NE. Testes: NIT= redução de nitrato a nitrito ou azoto; TRP = degradação do triptofano; GLU = fermentação da glicose; ADH = produção de arginina dihidrolase; URE = produção de urease; ESC = hidrólise da esculina; GEL = hidrólise da gelatina; PNPG = p-nitrofenil-b-galactopiranosidase; GLU = utilização da D-glicose; ARA = arabinose; MNE = manose; MAN= manitol; NAG = n-acetil-glicosamina; MAL = maltose; GNT = gluconato de potássio; CAP = caprato; ADI = adipato; MLT = malato; CIT = citrato de trisódio; PAC = ácido fenil-acético.

Perfil	NIT	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
<i>A. baumannii</i>	7	0	0	0	0	14	0	0	100	100	0	0	0	0	7	100	100	100	100	100
<i>B. cepacia</i>	100	0	0	33	0	100	100	67	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>P. luteola</i>	67	0	0	33	0	100	100	100	100	100	100	33	100	100	67	67	0	100	100	67
<i>P. putida</i>	3	0	0	61	6	9	3	3	100	79	3	0	3	3	97	100	48	100	100	91
<i>S. maltophilia</i>	100	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	50	0	100	100	0
Inaceitável	87	20	13	33	27	93	80	60	100	100	33	20	87	80	53	100	100	100	100	100

Os isolados caracterizados como *P. luteola* diferiram de *P. putida* devido à capacidade de utilizar nitrato como aceptor de elétrons na ausência de oxigênio, hidrolizar esculina e gelatina, produzir β -galactopiranosidase, e usar manose, n-acetil glucosamina e maltose. A incapacidade de liquefazer a gelatina, não produzir pigmentos fenazínicos e não reduzir nitrato por *P. putida* são características que classicamente separam essa espécie de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

As espécies do gênero *Acinetobacter* pertencem à ordem Pseudomonadales, família Moraxellaceae. O perfil bioquímico dos isolados desse grupo foi semelhante aos isolados do grupo das pseudomonas – foram incapazes de utilizar triptofano e manitol, fermentar a glicose, mas usaram glicose, arabinose, caprato, malato, citrato e ácido fenilacético como fontes de carbono. Esse grupo de isolados diferiu de *P. luteola* devido à incapacidade de desnitrificar nitrato e produzir gelatinase. Diferiu dos isolados com perfil idêntico a *P. putida* por não produzirem arginina diidrolase e pela incapacidade de usar gluconato de potássio. A produção de arginina diidrolase faz a conversão anaeróbica da arginina a ornitina, liberando NH_3 e CO_2 . Nesse sistema ocorre síntese anaeróbica de ATP que é importante para manter a motilidade sob condições anaeróbicas das quais pseudomonas estritamente aeróbicas podem escapar (PALLERONI, 2005). *Acinetobacter* são multi-resistentes a antibióticos, incluindo aminopenicilinas, cloranfenicol, cefalosporinas e tetraciclina e formam biofilmes quando crescem em meio sem ferro sendo comumente encontradas em superfícies como plásticos e

vidros. Produzem sideróforos com alta afinidade para Fe(III), catecolatos e hidroxamatos e também têm receptores para sideróforos produzidos por outros organismos. Encontram-se amplamente distribuídas nos solos, na água e no lodo. Cerca de 0,001% da população cultivável do solo e da água pertencem ao gênero *Acinetobacter*. Já foram encontradas em nódulos de soja, peixe e vegetais congelados. São Gram-negativas e apresentam reações positivas para catalase e negativas para oxidase. *Acinetobacter* spp. são semelhantes a pseudomonas que vivem saprofiticamente. Utilizam nutrientes orgânicos, incluindo açúcares, ácidos graxos, alcoóis, hidrocarbonetos de cadeia linear, ácidos dicarboxílicos e aminoácidos (JUNI, 2005). O grupo dos isolados com perfil inconclusivo apresentou um conjunto de reações semelhante ao grupo das *Burkholderia cepacia* que se distinguiram devido à capacidade de degradar o triptofano, presença de metabolismo fermentativo anaeróbico e uso do manitol. Membros da família Burkholderiaceae também são generalistas, Gram-negativas e podem utilizar nitrato em anaerobiose. Produzem pigmentos fenazínicos solúveis em água, sideróforos dos tipos hidroxamatos e catecolatos, tais como, ornibactinas, pioquelim e cepabactina (PALLERONI, 2005).

Espécies de *Stenotrophomonas*, família Xanthomonadaceae, são aeróbias estritas, produzem pigmentos amarelos solúveis em água e formam colônias com baixa fluorescência. Não são tão versáteis nutricionalmente como as espécies do gênero *Pseudomonas*, mas também detêm capacidade para degradar hidrocarbonetos, herbicidas, tolueno, xilenos e querosene. O grupo das *Stenotrophomonas* se diferenciou de *P. putida* devido à incapacidade do primeiro em utilizar arabinose, gluconato de potássio e ácido fenilacético.

Burkholderia e *Stenotrophomonas* spp. foram inicialmente enquadradas no gênero *Pseudomonas* até que na década de 1960 os estudos de Stanier e colaboradores dividiram as centenas de espécies do gênero em grupos e subgrupos de acordo com o perfil nutricional (STANIER et al., 1966). Mais tarde, na década de 1970, os estudos de Palleroni corroboraram os estudos de Stanier e mostraram que as divisões propostas também se confirmaram através de homologia DNAr-RNAr. Desta forma, o gênero *Pseudomonas* foi dividido em cinco grupos permanecendo como *Pseudomonas stricto sensu* apenas os membros do grupo I de homologia que compreendem as espécies que produzem pioverdinas que são sideróforos fluorescentes. Estirpes dos gêneros *Burkholderia* e *Stenotrophomonas* foram alocadas nos grupos de homologia II e V, respectivamente (PALLERONI, 2005).

Pseudomonas spp. constituem um grupo com elevada heterogeneidade fenotípica e genotípica, entretanto, a semelhança de algumas características fenotípicas impedem uma diferenciação clara dos membros dos outros grupos de homologia. Além disso, esses estudos são realizados com uma ou poucas estirpes de uma espécie não sendo consideradas, portanto, as diferenças intraespecíficas existentes. A produção de sideróforos fluorescentes per si ainda é considerada para alocar uma estirpe no gênero *pseudomonas*, embora o gênero também inclua espécies não fluorescentes (PALLERONI, 2005). A fluorescência foi um critério utilizado para isolamento que, no entanto, não impediu no presente estudo e, outros estudos realizados anteriormente, que fossem obtidos grupos com perfil distinto do que geralmente é encontrado para esse táxon. Dessa forma, não se pretende concluir que os isolados pertencem aos táxons depositados no banco de dados do sistema API 20NE. Essa ferramenta apresenta limitações para fins de identificação devido à estreita base de dados com apenas 61 táxons, ao limitado número de testes fenotípicos e de ter sido desenvolvida para identificação de amostras clínicas (TRUU et al., 2009). Na moderna taxonomia, a definição de espécies é baseada na abordagem polifásica que utiliza desde informações relacionadas ao uso de compostos químicos, perfil lipídico das membranas, seqüenciamento do gene 16S RNAr e de genes do metabolismo funcional e hibridização (GILLIS et al., 1996).

Os isolados com perfil bioquímico idêntico a *P. putida* predominaram na coleção de solo pós-cultivo, possivelmente como resultado da pressão de seleção do meio King B, adicionado dos antibióticos de amplo espectro cloranfenicol e ampicilina. Os antibióticos usados são de amplo espectro, a ampicilina é um inibidor da síntese de parede celular de bactérias e o cloranfenicol é um inibidor de síntese protéica, bacteriostático, com toxicidade elevada (TORTORA, 2009). King e colaboradores (1954) desenvolveram dois meios de cultivo, deficientes em ferro, King A e King B para estudar a produção de pigmentos por *Pseudomonas* spp. King A favorece a produção de pigmentos fenazínicos que podem ser azuis como os de *P. aeruginosa* ou verdes e amarelos como de *P. aureofaciens*. Em contrapartida, King B favorece a produção de um amplo espectro de pigmentos fluorescentes produzidos por *pseudomonas* fluorescentes, podendo ser verdes, amarelos e vermelhos.

Uma elevada frequência de isolados com perfil bioquímico idêntico a *P. putida* também foi obtida a partir do isolamento e cultivo in vitro dos isolados da rizosfera de hortaliças, sendo que a maior abundância relativa desse perfil foi obtida da rizosfera (61%) em comparação com o solo (46%) (DIAS, 2008). Zago et al. (2011) utilizaram a mesma

metodologia e também encontraram maior frequência de isolados com perfil idêntico a *P. putida* na rizosfera de couve crescida em Argissolo amarelo que recebeu diferentes tipos de adubos orgânicos. Ao exemplo do presente estudo, ensaios utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo, mostraram maior abundância dessas populações na rizosfera das plantas em comparação com o solo, e outros nichos, tais como, endosfera, filosfera e espaços endofíticos (LUGTENBERG et al., 2009; COMPANT et al., 2010). Essas bactérias colonizam agressivamente as raízes das plantas porque são eficientes em utilizar uma gama de compostos exsudatos pelas raízes e produzem antibióticos e sideróforos (LOPER & GROSS, 2007). Nos solos, vivem de forma saprofítica, atuando na mineralização da matéria orgânica complexa em formas simples, disponíveis para as plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Esta espécie possui isolados com alto potencial biotecnológico, sendo utilizada para a promoção de crescimento, controle biológico, indução de tolerância a estresses em plantas e biorremediação (SINGH et al., 2011).

Inoculantes contendo *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter* spp. em suas formulações podem substituir ou complementar uma parcela expressiva dos fertilizantes químicos utilizados na produção agrícola intensiva, e seu desenvolvimento e pesquisa são estimulados pelo impacto econômico e ambiental que podem proporcionar. Isolados de *Acinetobacter* produziram sideróforos, AIA, antagonizaram patógenos do solo e promoveram o crescimento de milho (ROKHBAKHSH-ZAMIN et al., 2011) e trigo (PRASHANT et al., 2009). *Stenotrophomonas* spp. podem ser encontradas colonizando a região rizosférica de diversas espécies vegetais, especialmente crucíferas que exsudam aminoácidos sulfurados que favorecem a multiplicação dessa espécie bacteriana. Também podem oxidar enxofre elementar e torná-lo disponível às plantas, além disso, são antagonistas a bactérias fitopatogênicas, tais como *Ralstonia solanacearum* (MESSIHA et al., 2007). No estudo conduzido por Park et al (2005) estirpes de *S. maltophilia* que cresceram em meio sem adição de nitrogênio e produziram AIA foram obtidas da rizosfera de trigo, arroz e milho. *Burkholderias* nodulam leguminosas e também fixam nitrogênio de forma livre em associação com poaceas e outros grupos vegetais. Um isolado da espécie *B. tropica* vem sendo proposto para a inoculação comercial da cultura da cana-de-açúcar visando ao uso em larga escala (REIS et al., 2009) e *B. vietnamiensis* incrementou a biomassa e peso dos grãos de arroz (TRAN VAN et al., 2000 apud LUCY, 2004).

Um dos entraves para a utilização desses grupos bacterianos em inoculantes é o fato de que pertencem a gêneros que contêm espécies que são patógenos humanos oportunistas que causam infecções nosocomiais em pacientes imunodeprimidos, mas que raramente causam doenças em indivíduos imunocompetentes. Existem evidências de que isolados de origem clínica e ambiental, embora compartilhem mecanismos comuns à colonização das plantas e à virulência aos seres humanos, tais como o quorum sensing, a formação de biofilmes, a produção de sideróforos e antibióticos (BERG, 2009) podem ser diferenciados pela capacidade de aderência às células epiteliais, presença de genes que codificam toxinas e enzimas que danificam células humanas e resistência a antibióticos. No estudo conduzido por Prashant e colaboradores (2009) foi demonstrado que os isolados de *A. calcoeticus* da rizosfera diferem daqueles de origem clínica pela ausência de DNase, atividade hemolítica e quanto ao perfil de resistência a antibióticos. Minkwitz & Berg (2001) separaram isolados da rizosfera de isolados de origem clínica por comparação dos gene 16S RNAr, embora os dois grupos compartilhem a capacidade de antagonizar fungos que são patógenos de plantas e de seres humanos, de produzir quitinases e sideróforos. Suárez-Moreno et al. (2011) discutem que o gênero *Burkholderia* possivelmente se divide em dois conjuntos principais de acordo com as relações filogenéticas – patógenos humanos, de plantas e animais e bactérias promotoras do crescimento de plantas. Por essas razões, o risco biológico deve ser avaliado para cada agente específico, evitando-se generalizações acerca de gêneros e espécies.

5.2 Detecção da produção de biofilmes

Todos os 189 isolados avaliados formaram biofilme, observável a olho nu nas paredes do tubo de ensaio (**Figura 2**).

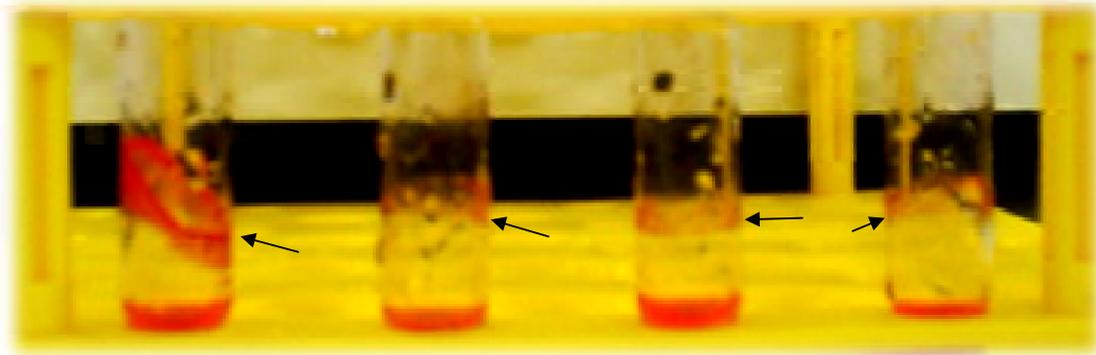


Figura 2. Formação de biofilmes nas paredes de tubos de ensaio por rizobactérias fluorescentes. Coloração com safranina ($0,05 \text{ g l}^{-1}$). Os biofilmes são indicados pelas setas.

Em ambientes hospitalares a formação de biofilmes é um problema grave uma vez que as bactérias inseridas nessas matrizes apresentam maior resistência a antibióticos e detergentes (TORTORA et al., 2005). Na rizosfera, a formação de biofilmes pode proteger as bactérias de interações negativas com outros organismos, evitando a predação e antibiose. Os biofilmes bacterianos são também importantes para a sobrevivência frente a estresses abióticos.

De acordo com Czaczyk & Myszka (2007), exopolissacarídeos (EPS) que participam da arquitetura dos biofilmes são capazes de aumentar as chances de estabelecimento de populações bacterianas quando inoculadas no solo e nas sementes. EPS são polímeros higroscópicos que acumulam massa em água superior à própria massa e por isso podem reduzir a perda evaporativa de água deixando as células bem hidratadas garantindo os ajustes metabólicos necessários para a manutenção durante períodos de estresse por falta de água e salinidade (COSTERTON, 1995; CHANG et al., 2007; CZACZYK & MYSZKA, 2007). Os EPS presentes no material capsular de bactérias podem ser lançados no solo onde são adsorvidos por argilas ou se ligam por meio de pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e adsorção aniônica formando uma cápsula ao redor dos agregados do solo. Nessas condições observa-se aumento no potencial de água ao redor das raízes, incremento na absorção de água

e nutrientes e, por conseguinte, maior acúmulo de matéria seca pela planta (ALAMI et al. 2000; MILLER & WOOD, 1996).

Sob condições de salinidade, os EPS podem diminuir o conteúdo de sais disponíveis para as plantas, por se ligarem a cátions como o Na⁺ o que reduz a absorção pelas raízes (GEDDIE & SUTHERLAND, 1993). *Pseudomonas* produzem diferentes tipos de EPS: levan, marginalan, celulose e alginato, cuja produção é induzida sob condições de estresse hídrico (KEITH et al., 1999; KACHLANY et al., 2001; CHANG et al. 2007). SANDHYA et al. (2009) demonstraram que a estirpe GAP-P45 de *P. putida* produziu quantidades significativas de EPS o que correlacionou positivamente com o incremento da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de girassol cultivadas sob condições de déficit hídrico.

Assim, a identificação dessa característica amplamente distribuída na presente coleção pode representar um potencial importante considerando a possibilidade de aplicação biotecnológica desses isolados para a promoção de crescimento de hortaliças. A capacidade de formar biofilmes pelos isolados, pode favorecer o seu estabelecimento quando forem artificialmente introduzidos aumentando as chances de estabelecimento de relações simbióticas com a planta hospedeira. Ainda a produção de biofilme pode aumentar a resistência da planta durante períodos de estresse favorecendo o crescimento vegetal.

5.3 Detecção da produção de sideróforos

A produção de sideróforos é um mecanismo chave para a competência de *pseudomonas* em se estabelecer na rizosfera das plantas (LEMANCEAU et al., 2007). No presente estudo, 135, perfazendo 71% do total de isolados foram considerados positivos para a produção de sideróforos. Do total, 88% dos isolados são provenientes da rizosfera e 43% do solo (**Tabela 3**).

Tabela 3. Detecção da biossíntese de sideróforos por bactérias isoladas de hortaliças. A coloração do meio está associada ao grupamento coordenador do ferro presente no sideróforo: amarelo: ácidos hidroxicarboxílicos; verde, ou laranja: hidroxamatos e roxo: catecolatos (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).

Origem	Cor do meio ¹			
	Amarelo	Verde	Laranja	Roxo
Rizosfera	5,04	73,33	17,15	3,81
Solo	13,32	53,34	33,34	0,00

¹ Percentual de isolados

A produção de sideróforos *in vitro* sugere que quando esses isolados forem inoculados na rizosfera das plantas visando à promoção de crescimento, essa estratégia pode ser utilizada para garantir competitividade frente a outros microrganismos e o estabelecimento. A maior frequência de isolados produtores de sideróforos na rizosfera em comparação aos provenientes do solo pode estar relacionada à importância desse mecanismo para o estabelecimento de populações bacterianas nas raízes (KAPSALIS et al. 2008; BERG et al., 2005). Em bactérias do grupo das pseudomonas já foi demonstrado que quando a produção de sideróforos é suprimida os isolados podem perder a capacidade de se estabelecerem (LEMANCEAU et al., 2007). No presente estudo, o solo de origem não apresenta deficiência de ferro o que pode explicar porque esse mecanismo não mostra ampla distribuição. Conforme demonstrado no estudo conduzido por Wei Jin et al. (2010), no solo rizosférico de plantas de *Trifolium pratense* crescendo sob deficiência de ferro, o número de isolados capazes de produzir sideróforos foi significativamente maior do que aqueles da rizosfera de plantas crescendo sem estresse. Os autores sugerem que possivelmente a elevada exsudação de isoflavonas, compostos fenólicos tóxicos para os microrganismos que são produzidos pelas plantas submetidas à deficiência de ferro, resultou na prevalência de comunidades resistentes produtoras de sideróforos.

Bactérias do grupo fluorescente das pseudomonas são capazes de produzir uma variedade de sideróforos que emitem fluorescência quando as colônias são iluminadas com luz ultravioleta (**Figura 3**). Essa característica classicamente define o grupo das pseudomonas que é isolado em meio King B que é capaz de estimular a produção de sideróforos. Por outro lado, a coleção em estudo é representada por 86% de isolados da rizosfera que apresentam perfil bioquímico idêntico a *Pseudomonas* sp. (DIAS, 2008) em contraste com 51% dos isolados de solo. Frente a esse quadro, é possível que os resultados obtidos para a produção de sideróforos tenham sido em função do gênero bacteriano e não propriamente de uma distribuição diferenciada entre as populações da rizosfera e do solo. Os outros grupos encontrados podem também produzir sideróforos, porém essa atividade pode não ter sido detectada com a metodologia usada. Diversos grupos de microrganismos têm sido identificados como capazes de produzir sideróforos, tais como patógenos de plantas, animais e seres humanos, bactérias que fixam nitrogênio de vida livre nos solos e associadas, além de endofíticos (COMPANT et al., 2005).

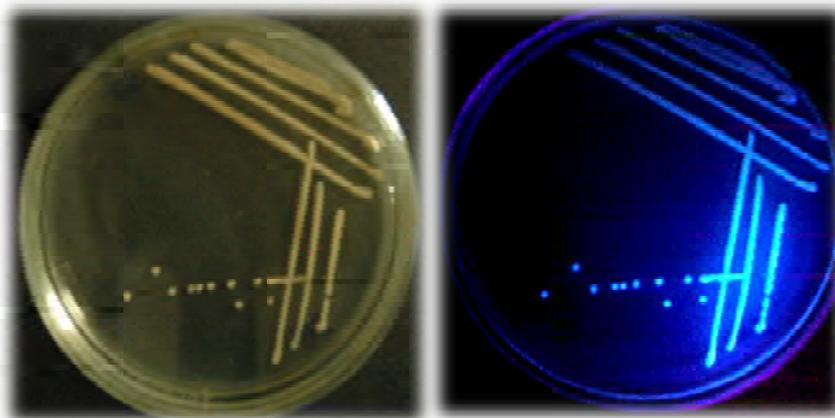


Figura 3. Isolado fluorescente R163 obtido da rizosfera de rúcula crescido em meio King B por 24 h. (Placa de Petri fotografada sob luz natural à esquerda e iluminada com luz ultravioleta à direita).

Mais de 500 tipos diferentes de sideróforos já foram identificados e embora se diferenciem na estrutura química, os grupos funcionais que coordenam o ferro são apenas três – hidroxamatos, catecolatos ou ácidos hidroxicarboxílicos (HASELWANDTER & WINKELMANN, 2007). Hidroxamatos são prevalentes em microrganismos presentes em solos ácidos e em plantas que acidificam a rizosfera. São ácidos orgânicos fracos tais como ferricromo, desferroxamina e hidroxiaminoquinolina (<http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh>). Fungos sintetizam sideróforos do tipo hidroxamato, principalmente ferricromos que têm moderada afinidade por Ferro(III).

Uma classe especialmente estudada de sideróforos são as pioverdinas produzidas por pseudomonas, já tendo sido descritos mais de cinquenta tipos (LEMANCEAU et al., 2007; VISCA et al., 2006). Além das pioverdinas, outros sideróforos vêm sendo descobertos com diferentes afinidades para Fe(III), alguns inclusive com atividade antimicrobiana como o tioquinolobactim produzido por *P. fluorescens* a partir do triptofano (MATTHIJS et al., 2007). CORNELIS (2010) discute que a produção de sideróforos com menor afinidade pode ocorrer quando a deficiência de ferro é menos dramática. Nessa situação, esses compostos atuam ainda como antibióticos e apresentam a vantagem adicional de serem sintetizados com menor gasto de energia do que as pioverdinas.

A produção de sideróforos é estimulada sob condições de baixos níveis de ferro, e também de elevadas concentrações de metais pesados (RAJKUMAR et al., 2010). Rajkumar

et al. (2010) discute a importância desse mecanismo em bactérias que podem estimular a fitorremediação de áreas contaminadas com alumínio, chumbo e outros metais. Os sideróforos quelam além do ferro, outros metais que numa forma complexada não causa dano às raízes e podem ser absorvidos e acumulados pelas plantas. Sideróforos também promovem a síntese de AIA por bactérias na presença de metais pesados quando é fortemente inibida.

No presente estudo, a maioria dos isolados, independentemente da origem, induziu a mudança de coloração do meio de azul para verde (93), seguido de laranja (28), amarelo (10) e roxo (4), o que possivelmente indica diferenças nas concentrações de sideróforos produzidos e, também, na estrutura química. A coloração do meio verde e laranja pode indicar a presença de hidroxamatos, amarela de ácidos hidroxicarboxílicos e roxa de catecolatos. Do total de isolados estudados, cerca de 90 % independente da origem devem ser produtores de sideróforos contendo hidroxamatos como o grupamento coordenador do ferro. De acordo com Pérez & Miranda (2007) sideróforos mistos, como as pioverdinas, piochelinas e pseudobactinas comuns em pseudomonas, são compostos por hidroxamatos e catecolatos e induzem uma coloração laranja avermelhada no meio de cultura que não foi detectada no presente estudo. A mudança de coloração do meio para roxo que indica a presença de catecolatos ocorreu em baixa proporção e foi observada apenas em isolados da rizosfera. Os catecolatos são produzidos por uma gama de espécies bacterianas, destacando-se a enterobactina de *Escherichia coli* e o ácido 2,3-hidroxibenzóico de *Bacillus* spp. (BENITE & MACHADO, 2002).

5.4 Detecção da produção de autoindutores ALHs

Em apenas 31% do total de isolados foi possível detectar a produção de ALHs pela presença de um halo azul ao redor das colônias em meio de cultura TY que continha a estirpe repórter *A. tumefaciens* NT1 (**Figura 4**). A produção de ALHs pode indicar que a biossíntese de uma gama de metabólitos importantes para a sobrevivência frente a estresses abióticos e a colonização rizosférica, tais como polissacarídeos extracelulares, enzimas, antibióticos e sideróforos, é dependente da densidade celular configurando em resposta conhecida como “quorum sensing” ou QS. Esta regulação é vantajosa porque permite que as bactérias iniciem a síntese desses metabólitos quando as concentrações de suas células alcançam um quorum mínimo, o que faz com que elas passem a agir de forma organizada como um organismo multicelular e, não mais como células individuais (COMPANT et al. 2010; HARTMANN et al., 2009; RUMJANEK et al., 2004).

Foi possível detectar a produção de ALHs em 27 isolados da rizosfera e 31 de solo pós-cultivo, representando 23 e 31% do total, respectivamente. Outros estudos indicam que a maior proporção de isolados com essa característica está presente na rizosfera em comparação com solos sem influência de raízes (DEANGELIS et al. 2008). No presente estudo, o solo de pós-cultivo amostrado na “Fazendinha Agroecológica Km47”, é rico em matéria orgânica proveniente da incorporação de insumos de origem orgânica – esterco, adubos verdes, vermicompostos e restos de folhas e raízes das culturas colhidas (NEVES et al., 2005). É possível que a maior proporção de isolados produtores de ALHs nos solos não associados a raízes seja um reflexo desse sistema que estimula a diversidade e a ocorrência de populações bacterianas que ainda sequer foram estudadas. Nos solos, a produção de ALHs tem sido associada à regulação da biossíntese de quitinases e proteases por pseudomonas e outros grupos bacterianos (DEANGELIS et al. 2008). Essas enzimas são importantes para a ciclagem do C e do N pela transformação de compostos com alto peso molecular em compostos mais simples que podem ser absorvidos pelas raízes das plantas.

Na rizosfera, as ALHs produzidas por bactérias podem exercer efeito sobre o crescimento das plantas. Rad e colaboradores (2008) mostraram que a produção de ALHs na rizosfera de *Arabidopsis thaliana* é capaz de alterar o balanço hormonal da planta e estimular o crescimento das raízes. Poonguzhali et al. (2007) mostraram que a produção de ALHs por uma estirpe de *Burkholderia* capaz de promover o crescimento de canola foi detectada cinco dias após a bactéria ter sido inoculada nas sementes. Em *P. fluorescens*, Wei & Zhang (2006) mostraram que um mutante defeituoso para a produção de ALHs devido à deleção do sensor *PcoI* na estirpe 2P24, foi incapaz de colonizar as raízes de trigo, embora não tenha interferido com a capacidade de produzir o antibiótico diacetilfluoroglucinol.

Em alguns estudos observa-se uma baixa proporção de isolados que produzem ALHs em comparação à produção de biofilmes e sideróforos, embora essas características estejam frequentemente correlacionadas em outros estudos (AREVALO-FERRO et al., 2005). O sistema QS envolve duas proteínas - uma receptora e uma homoserina lactona sintase que são homólogas ao Lux R e Lux I de *Vibrio fischeri*. No estudo conduzido por Arevalo-Ferro et al. (2005) verificou-se que cerca de 50% das proteínas controladas por QS em células planctônicas mostraram expressão diferente quando as células da estirpe IsoF de *P. putida* estavam em biofilmes. É possível que os isolados considerados negativos produzam outros sinalizadores que não foram detectados com a metodologia usada no presente estudo, tais

como peptídeos, furanosil di-éster, também conhecido como autoindutor-2, gama-butirolactonas ou quinolonas (CAMILLI & BASSLER, 2006; DECHO et al., 2010). Ainda assim, os estudos mostram que as ALHs são os autoindutores mais relevantes para pseudomonas e outras bactérias Gram-negativas (JUHAS et al. 2005). Fekete et al. (2007) discutem as principais técnicas utilizadas para detecção desses sinalizadores em bactérias e preconizam a associação de biossensores às técnicas de cromatografia e espectrometria de massas. No presente estudo, utilizou-se um biossensor, a estirpe NT1 de *A. tumefaciens*, que como os outros biossensores citados, têm uma deleção na biossíntese de ALHs e responde aos ALHs exógenos sendo um dos mais sensíveis à maioria das homoserinas lactonas produzidas. Degrassi et al. (2002) demonstraram que a co-produção de dipeptídeos cíclicos e ALHs pela estirpe WCS358 de *P. putida* é capaz de ativar o biossensor de *A. tumefaciens*, enquanto os dipeptídeos sintéticos são inertes.

Outra possibilidade que não foi investigada é a de que os isolados desse estudo possam ter interagido de forma negativa com a estirpe NT1 inibindo a sua capacidade de detecção dos ALHs produzidos.

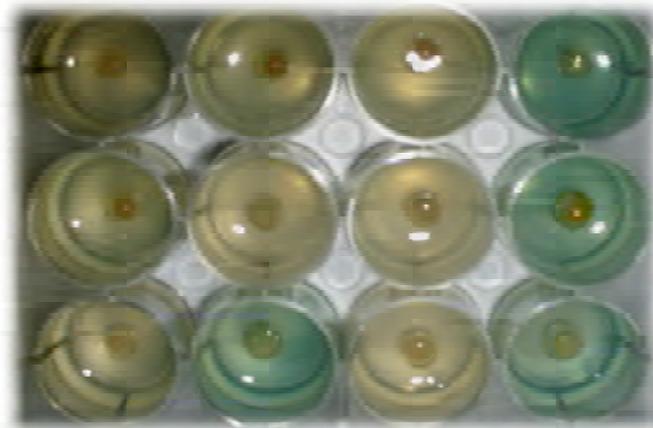


Figura 4. Detecção da biossíntese de acil-lactonas homoserinas por bactérias isoladas de hortaliças em meio de cultivo contendo a estirpe repórter NT1 de *A. tumefaciens*. A coloração azul do meio indica resultado positivo.

5.5 Detecção da produção de AIA e compostos indólicos relacionados

A produção de auxinas é um importante mecanismo através do qual bactérias promovem o crescimento das plantas. No presente estudo, de um total de 189 isolados, 95% produziram AIA e outros compostos indólicos relacionados (Anexo B). As médias das concentrações produzidas variaram de 1,76 a 887,65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e de 0,78 a 407,18 $\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO (unidade de densidade óptica). De acordo com a eficiência da produção de AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO), os isolados foram distribuídos arbitrariamente em 5 classes (**Tabela 4, Figura 5**). A classe I correspondeu a cerca de 5 % do total de isolados representada apenas pelos isolados do solo pós-cultivo (n=10) que não produziram quantidades detectáveis de AIA. A classe II apresentou 16% do total de isolados que produziram até 10 μg de AIA ml^{-1} UDO⁻¹. Desses a maior abundância relativa foi dos isolados da rizosfera. A classe III correspondeu aos isolados que produziram de 10 a 25 μg de AIA ml^{-1} UDO⁻¹ e totalizaram 36% do total de isolados. Na classe IV, 74 isolados representando 39% do total de isolados produziram de 25 a 100 μg de AIA ml^{-1} UDO⁻¹, com predominância dos isolados da rizosfera. Na classe V, cinco isolados, todos da rizosfera, produziram mais de 100 μg de AIA ml^{-1} UDO⁻¹.

Tabela 4. Distribuição dos isolados de pseudomonas fluorescentes isolados da rizosfera e do solo pós-cultivo de hortaliças em classes arbitradas de acordo com o nível de produção de compostos indólicos.

Classes	AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO ⁻¹)	Rizosfera ¹	Solo ¹	Total ¹
I	0	0	10 (14,3%)	10 (5,3%)
II	>0 a 10	25 (21%)	6 (8,6%)	31 (16,4%)
III	>10 a 25	36 (30,3%)	33 (47,1%)	69 (36,5%)
IV	>25 a 100	53 (44,5%)	21 (30%)	74 (39,2%)
V	>100	5 (4,2%)	0	5 (2,6%)
	Total	119	70	189

¹Número de isolados e percentual em relação ao total de cada origem.

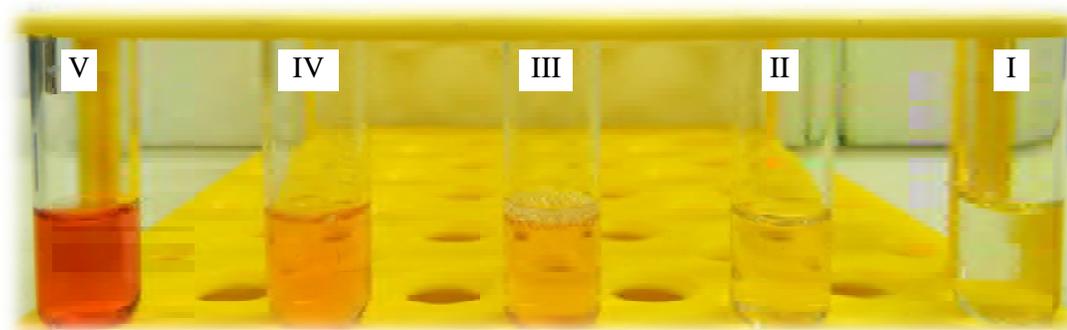


Figura 5. Exemplos de produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados por rizobactérias fluorescentes isoladas de hortaliças de acordo com classes arbitradas conforme a concentração de regulador produzida. Classes: I. não produziu; II. produziu até $10 \mu\text{g ml}^{-1} \text{UDO}^{-1}$; III. produziu mais do que 10 até $25 \mu\text{g ml}^{-1} \text{UDO}^{-1}$; IV. produziu mais do que 25 até $100 \mu\text{g ml}^{-1} \text{UDO}^{-1}$ e V. produziu mais do que $100 \mu\text{g ml}^{-1} \text{UDO}^{-1}$.

Os resultados obtidos *in vitro* a partir de um meio de cultivo suplementado com L-Trp sugerem que os isolados de solo e de rizosfera apresentam potencial para produzir AIA e outros compostos indólicos relacionados. Tsavkelova et al. (2005) e Gravel et al. (2007) mostraram que a produção de AIA varia entre gêneros e espécies bacterianas, sendo incrementada quando se adiciona triptofano ao meio de cultivo. O triptofano participa de pelo menos quatro vias de biossíntese deste regulador, e destas a indol-3-piruvato é a principal via biossintética onde a síntese do ácido indol-3-acético ocorre a partir da descarboxilação do indol-3-piruvato pela enzima indol piruvato descarboxilase que é codificada pelo gene *ipdC*. Em *P. putida* a expressão do gene *ipdC* é regulada pelo sistema RpoS que regula a expressão de genes sob estresses. Em *P. chlororaphis* o sistema de dois componentes GacS / GacA controla a expressão de genes que são induzidos durante a última fase do crescimento logarítmico e regulam negativamente a biossíntese de AIA dependente de triptofano. Ambos os sistemas RpoS e GacS / GacA são dependentes da concentração de autoindutores como as AHLs (HAAS & KEEL, 2003; SPAEPEN et al., 2009) que conforme dados apresentados na **seção 2.2.2** não foram amplamente detectadas no conjunto de isolados avaliados. A exemplo das ALHs, o AIA também pode atuar como uma molécula sinalizadora e assim controlar a expressão gênica em bactérias (SPAEPEN et al., 2009). Já foi relatado também que a produção de AIA é capaz de promover a interação entre as raízes e as populações bacterianas benéficas e fitopatogênicas, o que possivelmente explica o fato desta característica estar amplamente distribuída nas bactérias rizosféricas, ocorrendo a partir de diferentes vias metabólicas e resultando em diferentes respostas da planta

(SPAEPEN et al., 2007). Bactérias produzem AIA como parte da estratégia de colonização radicular incluindo fitoestimulação e confundindo as defesas da planta (SPAEPEN et al., 2009). Patten & Glick (2002) inocularam sementes de canola com um mutante da estirpe GR12-2 de *P. putida* deficiente na produção de AIA e verificaram que como esperado não houve estímulo ao crescimento radicular. Porém, a estirpe mutante deficiente foi capaz de se estabelecer na rizosfera em densidade próxima à da estirpe selvagem indicando que o regulador não era um mediador significativo para a colonização. Ainda deve se considerar que nesse caso, a produção de AIA na estirpe mutante não tenha sido totalmente silenciada, pois além das vias dependentes de triptofano existe uma via independente a partir do antranilato que é o precursor do triptofano, o que pode ter garantido a manutenção da colonização radicular pela estirpe mutante.

A produção de AIA pelas maioria dos isolados estudados pode indicar uma capacidade amplamente distribuída de colonização das raízes. É possível que as altas concentrações de AIA registradas nesse estudo não ocorram naturalmente na rizosfera das plantas uma vez que de acordo com Kamilova et al. (2009), na rizosfera, a produção de AIA pelas bactérias é dependente da quantidade de triptofano presente. Este aminoácido é comumente exsudado pelas raízes das plantas sendo as quantidades excretadas dependente da espécie, cultivar estágio de desenvolvimento e nutrição (ROVIRA, 1990; DAKORA & PHILLIPS, 2002). Spaepen et al. (2007) indicam que a limitação de carbono e a redução na taxa de crescimento no início da fase estacionária associados à alta densidade populacional, aumentam a biossíntese de AIA. A produção de AIA pelos isolados na rizosfera também depende dos genótipos de plantas que podem interferir na dinâmica e estrutura das populações bacterianas produtoras desse regulador de crescimento. Picard & Bosco (2008), demonstraram que a abundância das populações de *Pseudomonas* spp. produtoras de AIA na rizosfera de milho híbrido é o triplo daquelas encontradas nas linhagens parentais. Kochar et al. (2011) mostraram que a inoculação da estirpe Psd de *P. fluorescens* produtora de AIA aumentou o comprimento das raízes de sorgo, feijão-mungo-verde e trigo, mas não teve efeito sobre milho, aveia e mileto. Nesse estudo, a inserção de mais uma via de biossíntese em uma estirpe de pseudomonas foi capaz de aumentar em cinco vezes a produção de AIA, porém quando o mutante foi inoculado em sorgo, observou-se um efeito negativo sobre o crescimento das raízes.

5.6 Solubilização de fosfato de cálcio insolúvel

Bactérias que solubilizam fosfatos constituem de 1 a 50% da população total de bactérias na rizosfera, sendo que na população bacteriana essa característica é de 2 a 150 vezes mais freqüente do que de fungos (SPAEPEN et al., 2009). No presente estudo, 140 isolados da coleção em estudo, representando 74% do total, foram considerados positivos quanto à solubilização de fosfato demonstrado a partir da presença de halo de solubilização ao redor das colônias crescidas em meio GL (**Anexo C**). A maior parte das bactérias que solubilizam fosfatos são capazes de fazê-lo a partir do complexo Ca-P e em menor proporção a partir dos complexos Fe-P e Al-P (RODRIGUEZ & FRAGA; PÉREZ et al., 2007). Os isolados negativos foram incapazes de crescer no meio contendo fosfato insolúvel, embora todos os isolados fossem capazes de utilizar a glicose como fonte de carbono que tem sido reconhecida como capaz de promover significativamente a solubilização de P em bactérias fluorescentes (PARK et al., 2009). O elevado percentual de bactérias solubilizadoras detectados no presente estudo pode ser reflexo do agroecossistema a partir do qual foi efetuado o isolamento e sugere o potencial destes isolados para melhorar a disponibilidade de P na rizosfera das plantas. Barroti & Narras (2000) discutem que a população de microrganismos solubilizadores de fosfato, assim como, a eficiência da solubilização podem estar relacionadas às plantas de origem, tipo de solo e o manejo adotado. Em contraste, no estudo conduzido por Browne et al. (2009) com 752 pseudomonas fluorescentes isoladas de solos da rizosfera de trigo e aveia com manejo convencional e manejo com baixos níveis de adição de fertilizantes fosfatados desde 1996, foi observada acentuada queda no nível de fósforo no solo no segundo tipo de manejo. Nesse estudo, a reduzida adição de fósforo mineral diminuiu a densidade da população de pseudomonas, mas não teve efeito sobre a eficiência ou a freqüência de solubilizadores. Em geral, as bactérias da rizosfera são mais eficientes em solubilizar fosfatos de cálcio em comparação à isolados de outras fontes, sendo que essa capacidade pode ser perdida após uma série de cultivos em meios ricos (BAYA et al., 1981, GYANESHWAR et al., 2002). No presente estudo, a proporção de isolados positivos foi semelhante entre os isolados de rizosfera (75%) e de solo (73%) e tampouco foi observada diferença significativa entre a freqüência dos isolados distribuídos em três classes de acordo com a eficiência de solubilização (ES): baixa, média e alta calculada em função da razão entre o diâmetro do halo de solubilização e a colônia da bactéria (**Tabela 5**). Dentre esses, a maioria dos isolados, independentemente da origem apresentou baixa ES.

Tabela 5. Eficiência de Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias fluorescentes obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Avaliações foram realizadas aos 3, 6, 9 e doze dias de cultivo em meio GL contendo fosfato monocálcico. Médias de seis repetições. IS = índice de solubilização; ES = eficiência de solubilização.

Origem	N ¹	Eficiência de solubilização		
		Baixa ²	Média ²	Alta ²
Rizosfera	89	58,4	34,8	6,7
Solo	51	52,9	43,1	3,9

¹ Número de isolados positivos

² Percentual de isolados

Os isolados do solo AL21 e SA32, além dos isolados da rizosfera C354, A362, C312, R163, C122 e R123 apresentaram alta ES. Em todos os isolados positivos, exceto o CO42, houve formação de halo desde a 1^a. época de avaliação, ao terceiro dia de crescimento. As diferenças de ES encontradas ao longo do período de cultivo *in vitro* podem estar relacionadas à produção em quantidade e tipo de ácidos orgânicos produzidos. *Pseudomonas* spp. produzem de forma constitutiva uma série de ácidos orgânicos dentre os quais se destacam ácidos glucônico, oxálico, cetoglucônico, láctico, succínico, fórmico, cítrico e málico (COLLAVINO et al. 2010; VYAS & GULATI, 2009). Os resultados de Park et al. (2009) mostraram que a produção de ácidos orgânicos e a solubilização de P pela estirpe RAF15 de *P. fluorescens* ocorreram em paralelo às etapas do crescimento bacteriano atingindo o máximo ao final da fase log e início da fase estacionária a partir da qual não se observou mais aumento na concentração de P solúvel. Além da acidificação da rizosfera, *pseudomonas* podem quelar o Fe e o Al complexados com o P (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). A **Figura 6** mostra a evolução do índice de solubilização durante as 4 épocas de avaliação, mostrando que os isolados AL21 e SA32 apresentaram já no terceiro e sexto dia ES máxima.

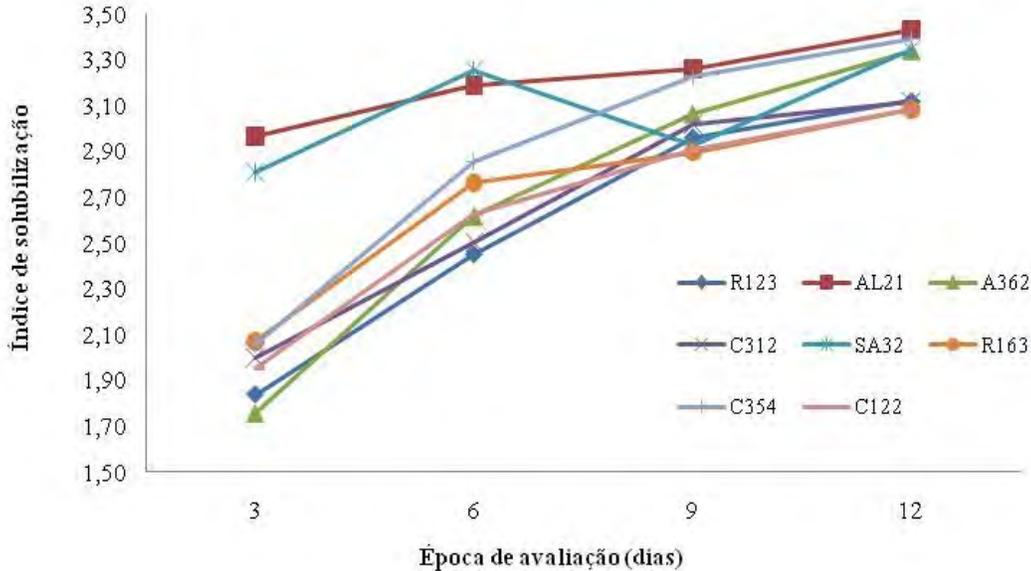


Figura 6. Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças com alta eficiência de solubilização.

A avaliação da ES dos isolados em alguns casos, menospreza o tamanho do diâmetro do halo de solubilização que também é uma medida que pode aferir o potencial dos isolados. Observa-se na **Figura 7** que a estirpe C317 apresentou um halo de solubilização bastante evidente (31,86 mm), mas em função do tamanho da colônia foi classificada como baixo ES. É possível que a aplicação desse índice ocasione a perda de estirpes que poderiam ser importantes para as avaliações *in vivo* futuras. A **Figura 8** mostra a correlação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo para os 140 isolados considerados positivos quanto à solubilização de fosfato. Observa-se que para a maior parte dos isolados à medida que aumenta o tamanho da colônia, aumenta o tamanho do halo mantendo-se uma proporção semelhante entre os dois parâmetros. Porém, é possível identificar alguns grupos que se afastam dessa proporção. Foram considerados para tal, os grupos I, II e III. No grupo I encontram-se isolados com menor diâmetro de colônia, porém com halos maiores do que a média, no grupo II e III, colônias com maior diâmetro e com halos maiores do que média, respectivamente. Isolados desses grupos serão avaliadas em estudos *in vivo*, além do material considerado promissor de acordo com a eficiência de solubilização, pois não podemos concluir ainda, se na prática, um desses comportamentos em meio de cultivo guarda relação com a eficiência do uso de adubos fosfatados.

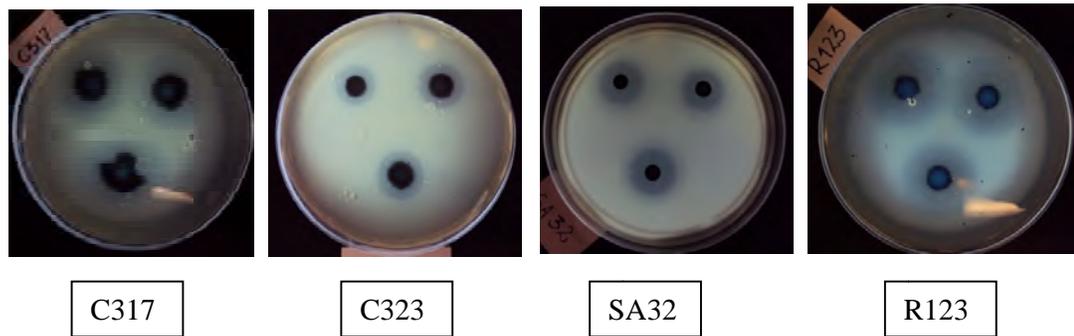


Figura 7. Solubilização de monofosfato de cálcio por bactérias fluorescentes obtidas do solo e da rizosfera de hortaliças. Isolados com baixa eficiência de solubilização: C317 e C323; Isolados com alta eficiência de solubilização: SA32 e R123.

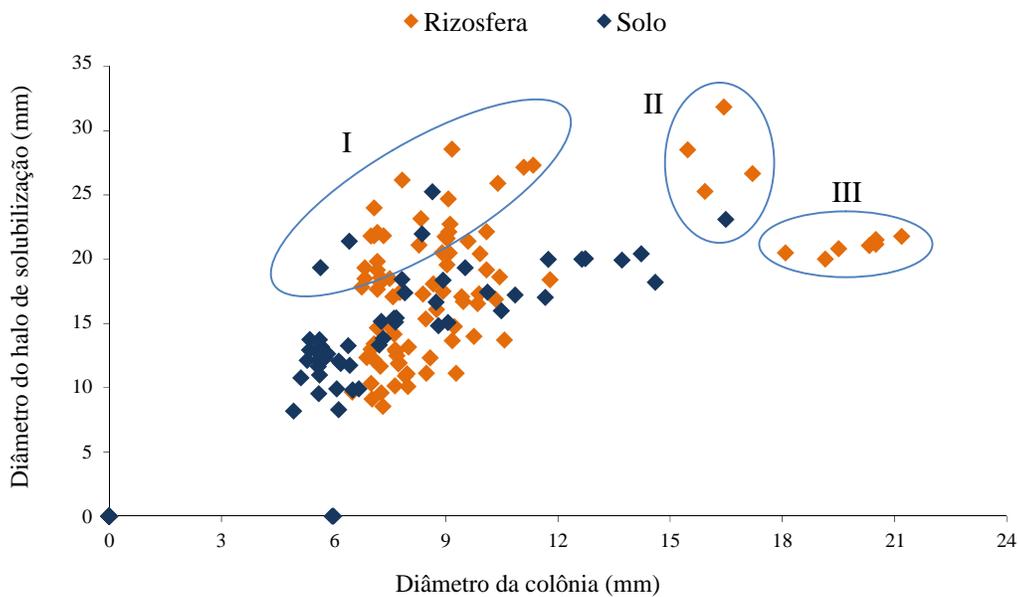


Figura 8. Relação entre o halo de solubilização de fosfato monocálcico e a colônia dos isolados da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças.

5.7 Promoção do crescimento da couve

Pseudomonas spp. fluorescentes detêm potencial para a promoção de crescimento de plantas e podem contribuir para a produção de hortaliças de alta qualidade. No presente estudo, foram realizados oito ensaios em casa de vegetação para avaliar um conjunto de 94 isolados quanto ao potencial de promover o crescimento de couve. Desses, 90 apresentaram perfil bioquímico idêntico à *Pseudomonas* sp.

No primeiro ensaio foram avaliados 11 isolados de solo de pós-cultivo de alface (5), salsa (4) e rúcula (2). Nenhum foi capaz de aumentar significativamente o crescimento das plantas de couve quando comparados à testemunha não inoculada. O isolado AL29 de alface diferiu dos isolados RU38, AL25 em relação à massa de matéria seca da parte aérea e massa de matéria seca total e dos isolados RU38 e SA24 em relação à massa de matéria seca das raízes (**Tabela 6**). Os isolados RU38 e AL 25 que causaram redução significativa da massa de matéria fresca da parte aérea das plantas inoculadas em comparação ao comportamento da melhor estirpe observada nesse estudo (AL29), também não mostrou diferenças significativas em relação à testemunha sem inoculação.

Tabela 6. Efeito da inoculação de bactérias fluorescentes provenientes de solo pós-cultivo de hortaliças sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições.

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
AL29	9,71	1,19 a	0,23 a	1,42 a
SA21	9,95	1,08 ab	0,21 ab	1,29 ab
Testemunha	9,04	1,07 ab	0,17 abc	1,24 ab
SA32	10,27	1,05 ab	0,18 abc	1,26 ab
AL27	8,71	0,98 ab	0,13 abc	1,11 ab
AL24	8,89	0,91 ab	0,18 abc	1,09 ab
SA33	7,09	0,86 ab	0,18 abc	1,04 ab
AL21	8,51	0,85 ab	0,18 abc	1,05 ab
RU26	7,77	0,83 ab	0,12 bc	0,96 ab
SA24	7,91	0,79 ab	0,10 c	0,89 ab
RU38	6,13	0,64 b	0,13 bc	0,76 b
AL25	6,31	0,63 b	0,14 abc	0,77 b
CV (%)	27,32	24,57	28,72	23,55

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir do resultado negativo obtido para os isolados de solo não associado, nos ensaios subsequentes foram avaliados apenas isolados oriundos da rizosfera. Nos ensaios II, III e IV foi avaliado um total de 52 isolados que não proporcionou aumento significativo das variáveis analisadas. Os dados referentes a esses ensaios encontram-se disponíveis no Anexo D.

No quinto ensaio foram avaliados 15 isolados das rizosferas de couve (12), salsa (2) e alface (1). O isolado C227 e C183 aumentaram a massa de matéria seca das raízes em quase três vezes a massa observada nas raízes das plantas testemunhas, esse aumento de matéria

seca da raiz foi acompanhado de aumento da parte aérea de mais de duas vezes a massa seca da raiz da testemunha (**Tabela 7; Figura 9**).

Tabela 7. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio V).

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)*	MSR (g)	MST (g)
C227	13,55	2,13	0,65 a	2,77 a
C183	13,32	2,02	0,60 ab	2,68 a
C315	8,18	1,22	0,35 abc	1,57 ab
C1123	10,32	1,41	0,34 abc	1,75 ab
C373	10,59	1,43	0,34 abc	1,77 ab
C335	11,75	1,47	0,33 abc	1,80 ab
S221	10,90	1,53	0,39 abc	1,92 ab
C352	11,41	1,72	0,40 abc	2,11 ab
C312	9,88	1,26	0,29 bc	1,55 ab
S231	9,79	1,26	0,31 bc	1,56 ab
A312	7,58	1,07	0,18 c	1,25 ab
C287	9,03	1,10	0,26 c	1,36 ab
C332	9,06	1,19	0,21 c	1,39 ab
C356	8,29	1,31	0,23 c	1,54 ab
C267	10,02	1,47	0,26 c	1,73 ab
Testemunha	7,10	0,89	0,17 c	1,06 b
CV (%)	37,84	41,38	44,51	40,47

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

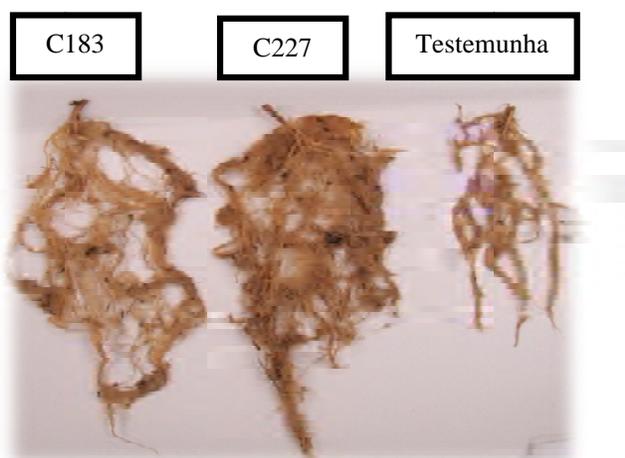


Figura 9. Matéria seca de raiz de couve inoculada com rizobactérias provenientes de hortaliças.

No sexto ensaio para as quatro variáveis analisadas observou-se diferença significativa promovida pela inoculação com alguns isolados de rizobactérias em comparação com a testemunha não inoculada. Os isolados C3113, C1133, C317, C112, R1132, S3103, S393 e C1143 promoveram o crescimento das plantas inoculadas por estimular o acúmulo de massa de matéria seca total (**Tabela 8**). O isolado C3113 e o C1133 promoveram tanto o crescimento da parte aérea como das raízes em relação à testemunha não inoculada enquanto os isolados C317, C112, R1132 e C1143 promoveram acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea superior à testemunha. Na **Figura 10** é possível observar as diferenças obtidas pela inoculação com algumas rizobactérias e a testemunha não inoculada.

Tabela 8. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleracea* cv. *acephala*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (Ensaio VI).

Tratamento	MFPA (g)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
C3113	6,75 ab	0,82 a	0,854 a	1,67 a
C1133	7,47 a	0,894 a	0,722 ab	1,62 a
C317	7,03 a	0,864 a	0,598 abc	1,46 a
C112	6,63 ab	0,806 a	0,616 abc	1,42 a
R1132	6,28 ab	0,808 a	0,678 abc	1,49 a
S3103	6,00 ab	0,77 ab	0,63 abc	1,40 a
S393	6,47 ab	0,782 ab	0,642 abc	1,42 a
C1143	6,58 ab	0,806 a	0,55 abc	1,36 ab
S333	6,11 ab	0,694 ab	0,414 bc	1,11 ab
Testemunha	3,13 b	0,386 b	0,266 c	0,65 b
CV (%)	28,39	25,27	33,26	24,56



Figura 10. Promoção do crescimento de couve de folha por rizobactérias isoladas de hortaliças.

No sétimo ensaio foram avaliados 10 isolados, dentre esses 8 isolados foram avaliados no ensaio anterior: S333, S3103, C112, C1143, R1132, C3113, C317, C1133 (**Tabela 9**). Os isolados C317, C1133, S3103 incrementaram a massa de matéria fresca da parte aérea diferindo significativamente da testemunha sem inoculação (**Tabela 9**).

Tabela 9. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio VII).

Tratamento	MFPA (g)	MSPA (g)*	MSR (g)*	MST (g)*
C317	4,24 a	0,44	1,07	1,52
C1133	3,95 ab	0,43	1,01	1,44
S3103	3,91 ab	0,43	1,46	1,89
C393	3,60 abc	0,40	0,98	1,38
S333	3,39 abc	0,38	0,80	1,18
C3113	3,24 abc	0,41	1,32	1,73
R342	2,91 abc	0,32	1,34	1,66
R1132	2,86 abc	0,32	0,84	1,16
C1143	2,71 abc	0,36	0,68	1,04
C112	2,54 bc	0,40	0,86	1,26
Testemunha	2,16 c	0,25	0,71	0,96
CV (%)	23,00	31,37	50,30	40,02

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No oitavo ensaio foram avaliados 10 isolados das rizosferas de rúcula (5), couve (2), alface (1) e salsa (2). Os isolados R1102, R163 e S393 incrementaram a massa de matéria seca da parte aérea e diferiram significativamente da testemunha sem inoculação (**Tabela 10**).

Tabela 10. Efeito da inoculação de rizobactérias sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae* cv. *acephala*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si (Ensaio VIII).

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)	MSR (g)*	MST (g)*
R1102	5,48	0,73 a	0,50	1,23
R163	5,64	0,75 a	0,41	1,16
S393	5,52	0,80 a	0,61	1,41
A329	4,63	0,45 b	0,39	0,85
R166	5,76	0,56 b	0,55	1,11
R171	5,51	0,56 b	0,59	1,16
R342	4,87	0,59 b	0,48	1,07
S262	5,87	0,59 b	0,61	1,19
C1113	5,96	0,63 b	0,44	1,08
C316	5,80	0,64 b	0,43	1,07
Testemunha	5,21	0,46 b	0,41	0,87
CV (%)	18,63	22,32	30,79	19,62

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De um total de 94 isolados avaliados em oito experimentos, 12 promoveram o crescimento de plantas de couve enquanto, 82 não tiveram efeito significativo em qualquer das variáveis analisadas. A **Tabela 11** sumariza o efeito da inoculação de todos os isolados avaliados mostrando o percentual médio de incremento ou de redução das variáveis MFPA, MSPA, MSR e MST em relação à testemunha sem inoculação. Os isolados C227 e C183 induziram um incremento das raízes em 276% e 247% e a massa de matéria seca total das plantas inoculadas em 161,5% e 153%, respectivamente. Os isolados S3103, C112, C1143, R1132, C3113, C317 e C1133 foram testados no sexto e sétimo ensaios. No sexto, esses isolados promoveram incrementos de mais de 90% na massa de matéria seca da parte aérea e na massa de matéria seca total. No sétimo, excetuando o isolado C1143 que não promoveu incremento na MSR, todos os outros isolados incrementaram as variáveis analisadas, porém o percentual de incremento foi menor sendo significativo para a MFPA em 96,47%, 83,22%, 81,27% das plantas inoculadas com os isolados C317, C1133 e S3103, respectivamente. No ensaio VIII, os isolados R1102, R163 e S393 promoveram incremento da MSPA das plantas inoculadas em 58,20%, 63% e 72,83%, respectivamente. O isolado S393 foi avaliado também no ensaio VI aumentando significativamente a MST das plantas inoculadas em 118,4%. Houve variação da resposta à inoculação das plantas com o mesmo isolado, quando se compara os diferentes ensaios realizados. Vários autores discutem essa ausência de estabilidade da resposta à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de vida livre, seja para a promoção de crescimento direta ou indireta pelo controle biológico de patógenos de solo. Lucy (2004) sugere que as variações podem ser função de uma série de fatores, bióticos e abióticos que interferem na síntese de metabólitos e no estabelecimento das bactérias na rizosfera. Em geral, insucessos decorrentes de inoculações artificiais têm sido atribuídos ao fato das populações introduzidas declinarem rapidamente devido à incapacidade de competição por exsudatos frente à biota residente e de sobrevivência quando expostas à predação por protozoários, além do efeito de estresses abióticos relacionados ao pH rizosférico, à temperatura e à umidade do solo (STRIGUL & KRAVCHENCO, 2006). No estudo conduzido por Fischer et al. (2010) foi demonstrado que a inoculação da rizosfera de trigo aos 60 dias com duas estirpes de *Pseudomonas* sp. promotoras de crescimento vegetal resultou em uma considerável redução no número de células viáveis de 10^8 para 10^4 UFC ml⁻¹. Apesar disso, o efeito positivo sobre o crescimento das plantas foi observado. Variações de resposta são freqüentes, porém Lucy (2004) pondera que a inoculação de BPCPs leva a um efeito global positivo num conjunto de ensaios.

No presente estudo, apesar da variabilidade de resposta, as estirpes que mostraram efeitos positivos em dois ou mais ensaios mostram um potencial como promotoras de crescimento que talvez se confirme em condições de campo. Nesse sentido, conhecer as variáveis que interferem na resposta à inoculação é importante para direcionar o manejo visando a maximização do efeito. Por exemplo, sabemos que o potencial das bactérias existe e isso pode se expressar ou não num fenótipo desejado, então de que forma podemos contribuir para mantê-lo dentro de uma flutuação aceitável? BPCPs reconhecidamente expressam melhor os mecanismos de promoção sob condições de baixos níveis de nutrientes (GLICK, 2007). Piromyou et al. (2011) conduziu um estudo onde era adicionado um composto que isoladamente não promoveu o crescimento das plantas, mas combinado com a inoculação bacteriana teve efeito positivo. No estudo conduzido por SHAHAROONA et al. (2008) demonstrou-se que o efeito positivo da inoculação de trigo com estirpes de *Pseudomonas fluorescens* que produzem ACC desaminase foi inversamente proporcional à aplicação conjunta de doses crescentes de NPK. Nessa linha, Ademoye & Kloepper (2009) discutem que o uso de inoculantes microbianos pode fazer parte de um manejo integrado da adubação em que são empregados baixos níveis de fertilizantes químicos. A combinação de bactérias e adubos minerais propicia uma melhor eficiência do fertilizante químico, reduzindo a sua adição. Esta abordagem não sacrifica a alta produtividade em curto prazo e nem a sustentabilidade em longo prazo. Alabouvette et al. (2006) apontam para a necessidade de mais estudos que abordem as tecnologias de aplicação e o uso de consórcios de microrganismos que atuem de maneiras diferentes. Pliego (2010) chama atenção para a necessidade de se aumentar o conhecimento da ecologia microbiana na rizosfera, e pondera, também, como as complexas interações de processos químicos, físicos e biológicos interferem na atuação desses organismos. Compant et al. (2010) questionam a respeito do pouco entendimento de como essas bactérias colonizam os nichos no hospedeiro, bem como, da comunidade bacteriana viável, mas não cultivável que coloniza a rizosfera.

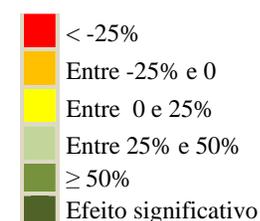
É importante ressaltar que não se pode esperar resultados semelhantes para as inoculações microbianas e nem enxergá-las com a mesma lógica que garante o uso de fertilizantes minerais. O componente biológico exerce mais do que um incremento pontual da biomassa. Há que se considerar a importância das populações de BPCPs para os agroecossistemas, exercendo de forma direta e indireta a promoção de crescimento, seja pela maior disponibilidade de nutrientes, pelo controle de fitopatógenos de solo, pela indução de resistência a estresses, ou pela produção de reguladores vegetais. Hoje a agricultura não pode

mais ser vista como o “trade-off” clássico entre alta produtividade e equilíbrio do agroecossistema que é sustentado pelos processos biológicos e pela biodiversidade (SINGH et al., 2011).

Apesar de 84 isolados não apresentarem diferenças significativas, nos diferentes ensaios, em relação à testemunha sem inoculação, 12 deles se destacaram por proporcionarem aumento no crescimento das plantas, principalmente do sistema radicular em mais de 50%. Estes foram C315, S231, C312, C267, C1123, C373, S383, C142, S221, C352, C335 e S333, testados nos ensaios V, VI, VII e VIII.

Tabela 11. Efeito da inoculação de bactérias obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças sobre o percentual da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação. A. Ensaios de I até IV; B. Ensaios de V até VIII.

Legenda



A

Ensaio	I				II				III				IV			
	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST
AL25	-30,20	-41,10	-17,60	-37,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU38	-32,19	-40,20	-23,53	-38,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1142	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,29	0,47	-16,99	-2,37	-	-	-	-
A161	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,51	2,64	11,65	4,10	-	-	-	-
A171	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,35	-4,52	-7,77	-5,05	-	-	-	-
A242	-	-	-	-	-2,57	-1,95	4,15	-0,64	-	-	-	-	-	-	-	-
A263	-	-	-	-	-	-	-	-	5,48	5,56	15,05	7,10	-	-	-	-
A383	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,36	11,98	-17,39	6,84
AL21	-6,00	-20,56	5,88	-16,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL24	-1,60	-14,95	5,88	-12,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL27	-3,70	-8,41	-23,53	-10,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL29	7,40	11,21	35,29	14,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C117	-	-	-	-	7,56	6,05	-3,40	4,03	-	-	-	-	-	-	-	-
C152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-13,40	-11,06	-8,70	-10,65
C161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,92	5,99	-10,87	3,04
C162	-	-	-	-	5,57	-0,20	-3,77	-0,97	-	-	-	-	-	-	-	-
C193	-	-	-	-	6,57	-1,33	-9,43	-3,06	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 11 A. Continuação...

C247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,22	14,75	2,17	12,55	
C257	-	-	-	-	-	-	-	-1,16	-2,83	2,43	-1,97	-	-	-	-	
C277	-	-	-	-	4,41	-5,33	6,04	-2,90	-	-	-	-	-	-	-	
C318	-	-	-	-	5,25	-1,95	-9,43	-3,55	-	-	-	-	-	-	-	
C323	-	-	-	-	0,21	-0,61	4,53	0,48	-	-	-	-	-	-	-	
C324	-	-	-	-	3,47	-10,35	-19,62	-12,33	-	-	-	-	-	-	-	
C337	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,18	11,52	10,87	11,41	
C346	-	-	-	-	-	-	-	-	4,71	0,94	3,40	1,34	-	-	-	
C354	-	-	-	-	1,68	-14,04	-29,81	-17,41	-	-	-	-	-	-	-	
R1112	-	-	-	-	3,10	3,07	4,15	3,30	-	-	-	-	-	-	-	
R123	-	-	-	-	4,20	0,31	-2,64	-0,32	-	-	-	-	-	-	-	
R132	-	-	-	-	3,78	1,95	-18,11	-2,34	-	-	-	-	-	-	-	
R133B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-6,34	7,37	-8,70	4,56	
R142	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,13	2,07	-5,83	0,79	-	-	-	
R152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,62	23,50	17,39	22,43	
R153	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,29	1,23	7,28	2,21	-	-	-	
R183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,14	19,35	-13,04	13,69	
R192	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,84	0,38	14,56	2,68	-	-	-	
R223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,56	5,07	-8,70	2,66	
R243	-	-	-	-	-	-	-	-	-6,58	-4,34	2,91	-3,16	-	-	-	
R3112	-	-	-	-	-	-	-	-	-10,96	-9,43	-20,87	-11,29	-	-	-	
R3132	-	-	-	-	3,94	-3,69	-2,64	-3,46	-	-	-	-	-	-	-	
R3142	-	-	-	-	1,26	-2,25	-2,26	-2,26	-	-	-	-	-	-	-	
R322	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,75	10,14	-15,22	5,70
RU26	-14,06	-22,43	-29,41	-23,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,64	1,51	-7,77	0,00	-	-	-	
S112	-	-	-	-	14,08	10,86	16,23	12,01	-	-	-	-	-	-	-	
S1122	-	-	-	-	4,52	-3,48	-5,28	-3,87	-	-	-	-	-	-	-	
S113	-	-	-	-	-2,89	-11,68	-5,66	-10,39	-	-	-	-	-	-	-	
S1132	-	-	-	-	6,88	0,92	-18,87	-3,30	-	-	-	-	-	-	-	
S142	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,68	-0,57	-17,96	-3,39	-	-	-	
S211	-	-	-	-	1,31	-13,63	-16,23	-14,18	-	-	-	-	-	-	-	
S241	-	-	-	-	-0,11	-4,20	4,53	-2,34	-	-	-	-	-	-	-	
S263	-	-	-	-	-1,47	-11,17	-22,26	-13,54	-	-	-	-	-	-	-	
S311	-	-	-	-	6,36	-4,51	-3,77	-4,35	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 11. Continuação...

S312	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,87	-1,32	3,40	-0,55	-	-	-	-
S324	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,35	-6,41	-3,40	-5,92	-	-	-	-
S353	-	-	-	-	-	-	-	-	0,77	-0,47	-2,91	-0,87	-	-	-	-
S373	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,64	-1,79	12,14	0,47	-	-	-	-
SA21	10,06	0,93	23,53	4,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA24	-12,58	-26,17	-41,18	-28,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA32	13,60	-1,87	5,88	-0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA33	-21,57	-19,63	5,88	-16,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S262	-	-	-	-	-	-	-	-	1,55	7,07	-5,34	5,05	12,82	27,17	47,27	36,68
C316	-	-	-	-	-	-	-	-	2,13	8,48	14,08	9,39	11,43	39,67	3,03	22,35
R166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,80	12,90	26,09	15,21
R171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A329	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B

Ensaio	V				VI				VII				VIII			
	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST	MFPA	MSPA	MSR	MST
C1133	-	-	-	-	138,65*	131,6*	171,4*	147,8*	83,22*	69,84	42,42	49,59	-	-	-	-
C317	-	-	-	-	124,6*	123,8*	124,81	124,2*	96,47*	76,19	50,56	57,26	-	-	-	-
C3113	-	-	-	-	115,65	112,4*	221,05	156,7*	50,23	64,29	85,11	79,67	-	-	-	-
C112	-	-	-	-	111,82	108,8*	131,58	118,1*	17,61	58,73	20,22	30,29	-	-	-	-
C1143	-	-	-	-	110,22	108,9*	106,77	107,98	25,39	42,06	0,00	7,47	-	-	-	-
S393	-	-	-	-	106,71	102,60	141,35	118,4*	-	-	-	-	6,05	72,82*	47,88	61,03
R1132	-	-	-	-	100,64	109,33	154,89	127,9*	32,34	26,19	18,26	20,33	-	-	-	-
S3103	-	-	-	-	91,69	99,48	136,84	115*	81,27*	69,84	105,06	95,85	-	-	-	-
C227	90,70	139,41	276,7*	161,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C183	87,60	127,25	247,6*	153*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,33	58,2*	20,61	40,40
R163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,26	63*	-1,21	32,66
S333	-	-	-	-	95,20	79,79	55,64	69,94	56,90	51,59	12,64	22,82	-	-	-	-
C393	-	-	-	-	-	-	-	-	67,01	57,94	37,36	42,74	-	-	-	-
R342	-	-	-	-	-	-	-	-	34,94	25,40	88,20	71,78	-	-	-	-
C335	65,42	65,54	90,70	69,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-6,34	27,17	16,97	22,35
C352	60,63	93,24	130,23	99,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S221	53,42	72,30	129,07	81,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C373	49,14	60,59	98,84	66,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1123	45,34	59,01	96,51	65,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C267	41,10	65,54	53,49	63,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C312	39,06	41,44	68,60	45,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S231	37,90	41,67	77,91	47,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C332	27,51	33,78	19,77	31,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C287	27,10	24,10	50,00	28,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C356	16,67	47,07	33,72	44,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C315	15,12	37,39	102,33	47,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A312	6,73	20,95	2,33	17,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.8 Caracterização das bactérias promotoras do crescimento da couve

Dez das doze rizobactérias reconhecidas como eficientes quanto à promoção do crescimento em couve folha tiveram o gene 16S RNAr seqüenciado. Excetuando-se o isolado S3103, todas as outras BPCPs foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e mostraram as características comuns à do grupo I do RNAr *stricto sensu* (PALLERONI, 1984). A Tabela 16 mostra os dados obtidos nas reações bioquímicas do kit API 20NE para esses isolados que não fermentam a glicose, mas a utilizam no metabolismo aeróbio, produzem arginina diidrolase e utilizam gluconato de potássio, caprato, malato e citrato (**Tabela 12**). O isolado R1102 diferiu dos demais pela atividade da gelatinase que é uma característica típica de *P. fluorescens* e *P. clororaphis*, enquanto o isolado S393 foi o único em que foi detectada atividade da β -galactopiranosidase,

Tabela 12. Caracterização bioquímica (Sistema Api 20NE, Biomerieux) e sequenciamento do gene 16S RNAr de rizobactérias promotoras do crescimento de couve (na: não foi avaliada)

Isolado	NIT	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	16S RNAr
S393	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
S3103	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
C3113	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
C1133	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
R163	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	na
C227	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	na.
C183	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
R1132	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
C317	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
C1143	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
C112	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
R1102	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.

Os resultados das análises comparativas das seqüências do 16S RNAr mostraram que estes isolados são similares a *P. putida* e *P. plecoglossicida* que é uma espécie que também pertence ao grupo I do RNAr e é muito similar a *P. putida*, mas pode ser diferenciada dessa última por ser capaz de utilizar L-Trp e o antranilato (Nishimori et al 2000). Como as estirpes bacterianas selecionadas não usaram o L-Trp é possível que estejam mais relacionadas a *P. putida* do que a *P. plecoglossicida*. Jha et al. (2009) relataram que estirpes de *P. plecoglossicida*

também solubilizam fosfato, produzem sideróforos, AIA, proteases, celulasas e ácido cianídrico. Os isolados R163 e C227 não foram seqüenciados, mas apresentaram perfil bioquímico idêntico ao do grupo de *P. putida*. O isolado S3103 foi caracterizado como *Bacillus* sp. apresentou o perfil bioquímico idêntico ao grupo de isolados de *S. maltophilia* – redução de nitrato a nitrito, degradação da esculina e gelatina, utilização de maltose e n-acetil glucosamina. Bactérias desse grupo também são reconhecidas como BPCPs e apresentam um grande potencial para aplicação biotecnológica na agricultura, promovendo o crescimento de plantas de forma direta e indireta (CHOUDHARY et al., 2009). Os isolados S393, C1133, R163 e C183 são antagonistas *in vitro* a *Rhizoctonia solani* e C112, R1102 e S3103, de *R. solani* e *Sclerotium rolfsii* (DIAS, 2008).

As bactérias do grupo fluorescente das pseudomonas são reconhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal. Detêm ampla capacidade metabólica, incluindo a utilização de uma variedade de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos presentes nos exsudatos de raízes e sementes (LOPER & GROSS, 2007). Promovem o crescimento direto de plantas e apresentam antagonismo e induzem resistência a patógenos habitantes do solo (COMPANT et al., 2010; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). A importância do grupo é crescente diante da capacidade de promover o crescimento de diversas espécies vegetais reduzindo o efeito de vários estresses abióticos. Já foram documentadas promovendo o crescimento de algodão (YAO et al., 2010), trigo (EGAMBERDIEVA, 2009), milho (BANO & FATIMA, 2009) e pepino (GAMALERO et al., 2009) sob estresse salino; de canola sob baixa temperatura (CHENG et al., 2007), de tomate sob alagamento (GRICHKO & GLICK, 2000), de videira sob altos níveis de cádmio (ARSHAD et al., 2007). Também são utilizadas na micropropagação de abacaxi (BALDOTTO et al., 2010) e para o enraizamento de estacas de eucalipto (MAFIA et al., 2005) e oliveira (PEYVANDIA et al., 2010).

Possivelmente, o efeito positivo desses isolados sobre o crescimento da couve está relacionado a dois fatores chave – a capacidade de colonizar o sistema radicular dessa espécie vegetal e aos mecanismos de promoção de crescimento. Nos ensaios realizados, foi utilizado um solo sem autoclavagem, portanto contendo uma comunidade de microrganismos já estabelecida. As inoculações foram realizadas aos 10 dias em plântulas saudáveis que provavelmente já haviam sido colonizadas por microrganismos autóctones, tais como, fungos e bactérias. Uma vez introduzidos em suspensões salinas, estes isolados tiveram que competir com a biota residente, utilizar os compostos presentes nos exsudatos para multiplicação e

crescimento celular e a partir daí estabelecer associações benéficas com o hospedeiro. Foi utilizado um solo com baixa fertilidade, adicionando-se uma solução nutritiva fraca, visando favorecer a resposta à inoculação. Nessas condições, garantir a associação com a planta suplanta o custo energético dispendido com a sua formação. Todos os isolados promotores de crescimento formaram biofilmes, produziram sideróforos e AIA e com exceção do isolado S3103, solubilizaram P (**Tabela 13**). Em apenas um isolado, S393, foi detectada a produção de lactonas homoserinas.

Tabela 13. Caracterização de rizobactérias promotoras do crescimento de couve quanto à formação de biofilmes (BF), produção de sideróforos, de acil lactonas homoserinas (ALH), de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e eficiência de solubilização de fosfato monocálcico (ES).

Isolado	BF	Sid	ALH	AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	classe	ES
S393	+	+	+	3,95	II	média
S3103	+	+	-	7,04	II	nula
C3113	+	+	-	24,73	IV	baixa
C1133	+	+	-	23,34	IV	média
R163	+	+	-	29,71	IV	alta
C227	+	+	-	29,37	IV	baixa
C183	+	+	-	29,67	IV	baixa
R1132	+	+	-	27,02	IV	média
C317	+	+	-	40,02	IV	baixa
C1143	+	+	-	40,04	IV	baixa
C112	+	+	-	41,74	IV	baixa
R1102	+	+	-	81,98	IV	média

Esses mecanismos têm sido frequentemente relacionados à atividade de promoção de crescimento por pseudomonas e outras bactérias benéficas (COMPANT et al., 2010). O estímulo ao crescimento das plantas possivelmente é resultado de um efeito sinérgico entre esses mecanismos que estão intimamente ligados. A capacidade de formar biofilmes sobre as raízes, possivelmente protegeu os isolados introduzidos e favoreceu a colonização radicular, mantendo a densidade celular suficiente para que fosse iniciada a produção de sideróforos levando a vantagem competitiva das bactérias introduzidas sobre as populações residentes devido à atividade antimicrobiana desses compostos e competição por ferro. Para o estabelecimento nas raízes também é necessário que as BPCPs estabeleçam uma troca de sinais com a planta (SPAEPEN, 2010). Assim a capacidade de produzir auxinas em baixas concentrações pelos isolados possivelmente minimiza as defesas da couve.

É reconhecido que os exsudatos radiculares exercem pressão de seleção sobre a comunidade bacteriana (HARTMANN et al., 2009). Brássicas produzem glucosinolatos que são convertidos a isotiocianatos que têm atividade anti-herbivoria e anti-microbiana quando a planta é injuriada ou atacada por patógenos. Rumberger & Marschner (2004) demonstraram que esses compostos causam profundas alterações na comunidade microbiana rizosférica durante o ciclo da couve. BPCPs competentes podem usar esses compostos como fonte de C, N e S e se estabelecer nas raízes (CHANDRA et al., 2007). A colonização é o primeiro passo para que ocorram interações entre bactérias promotoras de crescimento e plantas (BABALOLA, 2010). Na rizosfera da couve, a produção de AIA por estas bactérias pode ter ocorrido a partir do triptofano e do antranilato presentes em baixas concentrações nos exsudatos, suficiente para promover o crescimento das raízes (KRAVCHENKO et al. 2004).

O AIA produzido por bactérias pode mudar o *pool* de auxinas na planta estimulando a emergência de raízes laterais que otimizam a exploração do solo, melhorando a absorção de água e nutrientes essenciais como o P. BPCPs solubilizam P em complexos com cálcio, ferro e alumínio aumentando a eficiência de uso desse elemento pelas plantas (HODGE et al. 2009; YANG et al. 2009; ZAIDI et al., 2009). Além do P, BPCPs mostram potencial para incrementar a absorção de outros elementos do solo, tais como o N e Fe (GLICK, 2005; ADEMOYE & KLOEPPER, 2009).

O crescimento das raízes possivelmente resultou no crescimento integrado da parte aérea, aumento das taxas de fotossíntese e maior exsudação de compostos para o crescimento microbiano e nichos que foram colonizados pelas bactérias introduzidas. Assim essa série de processos pode ter contribuído para o efeito positivo sobre a biomassa das raízes e da parte aérea resultando no aumento da biomassa total. Outros mecanismos que não foram investigados no presente estudo podem também estar envolvidos na resposta de incremento do crescimento da couve, tais como a fixação de nitrogênio de vida livre e a produção da enzima ACC desaminase (GLICK et al., 2007; ZHAN, 2011).

5.9 Características bioquímicas *in vitro* dos isolados estudados e a promoção de crescimento da couve na casa de vegetação

Utilizou-se nesse estudo, uma abordagem que tem sido classicamente usada para selecionar BPCPs: (i) isolou-se as bactérias do grupo das pseudomonas de solo rizosférico e pós cultivo das plantas alvo, (ii) realizou-se a caracterização bioquímica dos isolados, (iii) avaliou-se o potencial *in vitro* desses isolados para formar biofilmes, produzir sideróforos, ALHs, AIA e

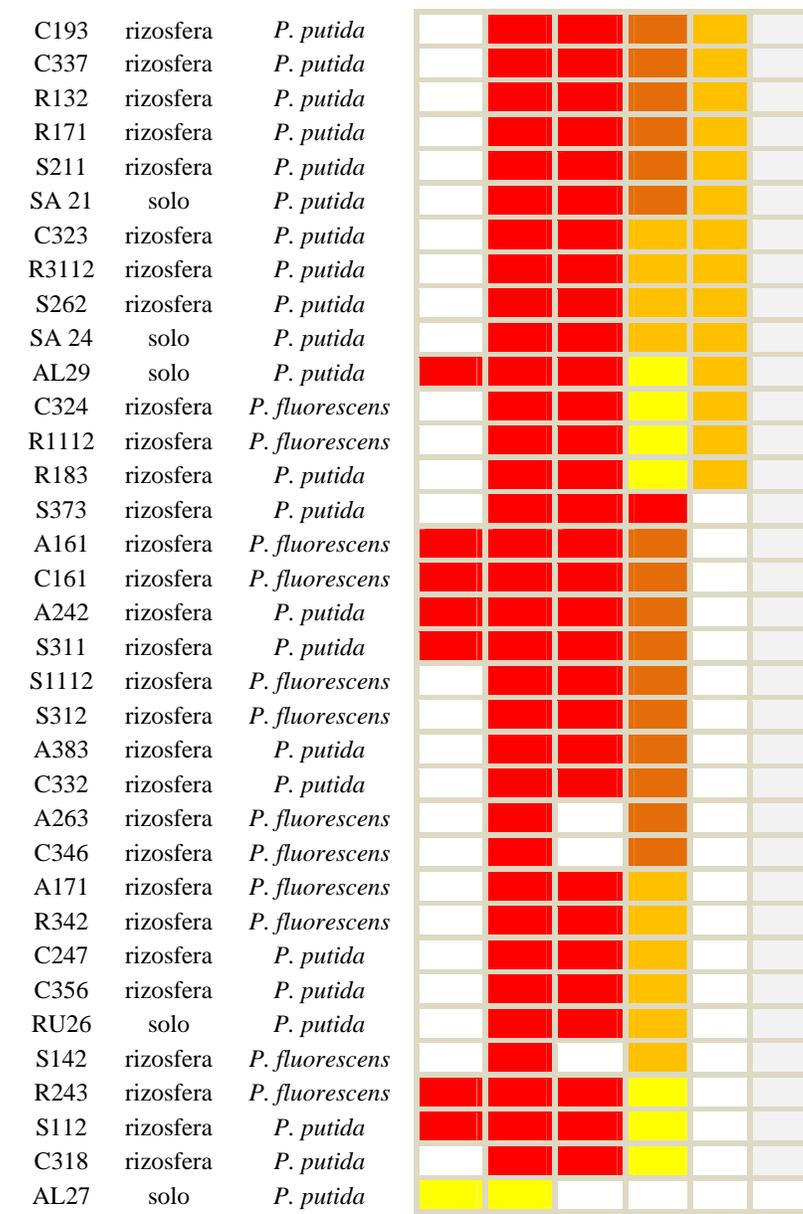
solubilizar P, e (iv) a capacidade de promoverem o crescimento de couve em casa de vegetação utilizando solo sem autoclavagem.

Em diversos estudos, resultados positivos em laboratório para a produção de sideróforos, solubilização de P e produção de AIA têm apoiado conclusões de que a identificação desses mecanismos *per si* possam conduzir à seleção de potenciais BPCPs, sendo considerados os isolados mais promissores aqueles em que foi identificada a máxima atividade *in vitro* (BROWNE et al., 2009, CHAIHARN et al., 2009; COLLAVINO et al., 2010; TAURIAN et al., 2010).

No presente estudo 96% (92/96) do total de isolados testados em casa de vegetação apresentaram perfil bioquímico idêntico a *Pseudomonas fluorescens*. Desses, 94% (91/96) produziram sideróforos, 76% (73/96) solubilizaram P, 98% (94/96) produziram AIA e 11% (11/96) promoveram o crescimento das plantas. HAAS & DEFAGO (2005) chamam atenção para a redução considerável do potencial dos isolados promissores à medida que se avançam nas etapas de seleção de bactérias para a promoção de crescimento e controle biológico, do laboratório para a casa de vegetação e para o campo. Além disso, os resultados desse estudo indicam que uma metodologia de seleção considerando a máxima atividade *in vitro* não garante efeito positivo sobre o crescimento das plantas. Uma pré-seleção *in vitro* de isolados para testes de promoção de crescimento em casa de vegetação pode mascarar os isolados mais promissores, pois na sua maioria os isolados estudados apresentaram baixa eficiência de solubilização de P e média produção de AIA (**Tabela 14**). O isolado R163 com alta ES não foi melhor do que os isolados com baixa ES e do que o isolado S3103 que não solubilizou P.

Tabela 14. Capacidade de isolados de rizosfera e solo pós-cultivo de hortaliças quanto à síntese *in vitro* de acil lactonas homoserinas (ALH), biofilmes (BF), sideróforos (SID), e ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e de solubilização de fosfato monocálcico (SF), e à promoção de crescimento de plantas de couve (*B. oleraceae* var. *acephala*) em casa de vegetação (PC).

Isolado	Origem	Taxon	ALH	BF	SID	AIA	SF	PC	Legenda
R163	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Média	Alta	Alta	
R1102	rizosfera	<i>P. fluorescens</i>	Alta	Alta	Alta	Média	Alta	Alta	
R1132	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Média	Alta	Alta	
C1133	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	
S393	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Muito baixa	Média	Alta	
C112	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	
C1143	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	
C183	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	
C227	rizosfera	<i>P. putida</i>	Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	
			Alta	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	



No estudo realizado por Collavino et al. (2010) também não foi associada alta eficiência de solubilização de dois isolados à promoção de crescimento de feijão, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos. Estirpes de pseudomonas que solubilizaram P *in vitro* aumentaram a biomassa de *Brassica rapa*, mas não aumentaram o P assimilado nos tecidos da planta (POONGUZHALI et al., 2008). De acordo com Taurian et al. (2010), 59 isolados que induziram halo de solubilização maior do que 1,5 mm em meio de cultivo contendo fosfato insolúvel não promoveram aumento da matéria seca das raízes de amendoim em vermiculita esterilizada. Com respeito a este mecanismo, Patel et al. (2011) investigaram a produção de ácido glucônico em *P. aeruginosa* e concluíram que baixas concentrações de ácidos málico e

succínico, geralmente presentes na rizosfera, inibem reversivelmente a atividade da glicose desidrogenase que é uma enzima chave para a síntese de ácido glucônico, o que pode estar relacionado à inconsistência desse mecanismo na rizosfera. No estudo conduzido por Chaiharn et al. (2009) também não houve correlação entre a quantidade de sideróforos produzidos no sobrenadante de *P. aureofaciens* e o antagonismo *in vitro* aos fungos *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* e *S. Rolfsii*.

No presente estudo, os isolados que promoveram o crescimento diferiram significativamente entre si quanto à concentração de AIA produzida não havendo uma correlação entre a quantidade produzida e a promoção de crescimento. A maioria dos isolados promotores de crescimento produziram AIA entre 25 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO, enquanto os isolados S3103 e S393 produziram até 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO. O isolado R1102 que produziu 81,98 $\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO não foi melhor do que o isolado S393 que produziu 3,95 $\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO. Esses resultados são aderentes aos de Jayasudha et al. (2010) que mostraram que plantas de amendoim não foram influenciadas por pseudomonas fluorescentes que produziram altas quantidades de AIA, mas por aquelas que produziram baixa e média concentrações. O mesmo foi observado por Ali et al. (2009) com trigo e Baudoin et al. (2010) que mostraram que uma estirpe geneticamente modificada de *Azospirillum brasiliense* que produziu altas concentrações de AIA sob condições de laboratório não foi capaz de promover o crescimento das raízes de trigo em casa-de-vegetação.

Embora a seleção *in vivo* em solo não estéril, seja mais trabalhosa e não revele os mecanismos envolvidos, do ponto de vista prático é mais recomendada do que os métodos *in vitro* conforme discutido por Pliego et al. (2010). Possivelmente, a incapacidade dos isolados em colonizar a rizosfera pode explicar a ausência de correlação entre o potencial de isolados em laboratório em meios ricos que favorecem a expressão destes fenótipos. Para a promoção de crescimento de plantas, a capacidade de se estabelecer é tão importante quanto à produção de AIA e a solubilização de P (VAN DILLEWIJN, 2008). Por um lado, os testes preconizados tentam garantir condições ótimas para a produção de determinados metabólitos pelas bactérias, no entanto, não há comprovação de que estas condições estejam também presentes *in vivo*. A adição de L-Trp no meio Triptona de soja maximizou em mais de cem vezes a produção de AIA. Da mesma forma, o meio GL suplementado com P insolúvel contém D-glicose que é constitutivamente convertida em ácidos orgânicos por pseudomonas. No solo e na rizosfera essas condições não existem ou são severamente limitadas. Kamilova et al. (2006) mostraram que a estirpe WCS365 de *Pseudomonas fluorescens*, que é capaz de

converter L-Trp em auxina *in vitro*, não estimulou o crescimento das raízes de tomate, mas promoveu o crescimento de nabo que exsudou nove vezes mais L-Trp. Para a seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas é possível que essa relação seja inexistente porque a promoção de crescimento é um fenômeno dependente de três pilares: hospedeiro responsivo, isolado competente e ambiente favorável entendido aqui como o conjunto de fatores bióticos e abióticos que influenciam o estabelecimento das populações de bactérias promotoras do crescimento e a fisiologia da planta hospedeira.

5.10 Efeito do consórcio de rizobactérias e do consórcio de rizobactérias e rizóbios no crescimento de couve

5.10.1 Consórcio de rizobactérias

Nesse ensaio foram avaliadas três rizobactérias com perfil bioquímico idêntico a *P. putida*: o isolado C337 avaliado no primeiro ensaio que não teve efeito sobre o crescimento das plantas inoculadas, mas produziu AIA e solubilizou P e os isolados C227 e C183 que promoveram o crescimento da couve no quinto ensaio e estão entre as rizobactérias selecionadas com potencial para a promoção do crescimento de couve. O isolado C337 novamente não proporcionou incremento significativo da biomassa das plantas inoculadas (**Tabela 15**). Por outro lado, os isolados C183 e C227 mostraram, pela segunda vez, capacidade de promover o crescimento das plantas inoculadas quando se avaliou os parâmetros MSR e MST. O isolado C183 proporcionou aumento também da MFPA e MSPA. O consórcio dos isolados C183+C227 proporcionou aumento de todas as variáveis, não diferindo do isolado C183, mas incrementou a média das massas de matéria fresca e seca da parte aérea em 27% e 35% respectivamente em comparação ao isolado C227 (**Figura 11**). A co-inoculação de C183+C337, C227+C337 e C183+C227+C337 não diferiu da testemunha sem inoculação anulando o efeito positivo dos isolados C183 e C227. O consórcio de C183+C337 levou a uma redução média do efeito positivo de C183 sobre as variáveis em mais de 50%, enquanto o consórcio de C227+C337 não teve efeito sobre a parte aérea, mas teve efeito negativo sobre o sistema radicular, diminuindo em cerca de 40% o percentual de incremento médio do sistema radicular das plantas inoculadas.

Tabela 15. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tratamento	MFPA (g)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
C183	6,38 a	0,97 a	2,21 a	3,18 a
C227	5,06 b	0,70 b	2,30 a	3,00 a
C337	4,87 b	0,62 b	1,81 b	2,44 b
C183+C227	6,42 a	0,94 a	2,48 a	3,42 a
C183+C337	4,45 b	0,62 b	1,61 b	2,23 b
C227+C337	5,44 b	0,73 b	1,88 b	2,62 b
C183+C337+ C227	4,55 b	0,70 b	1,54 b	2,24 b
Testemunha	4,02 b	0,51 b	1,24 b	1,75 b
CV (%)	22,44	29,67	28,18	25,37

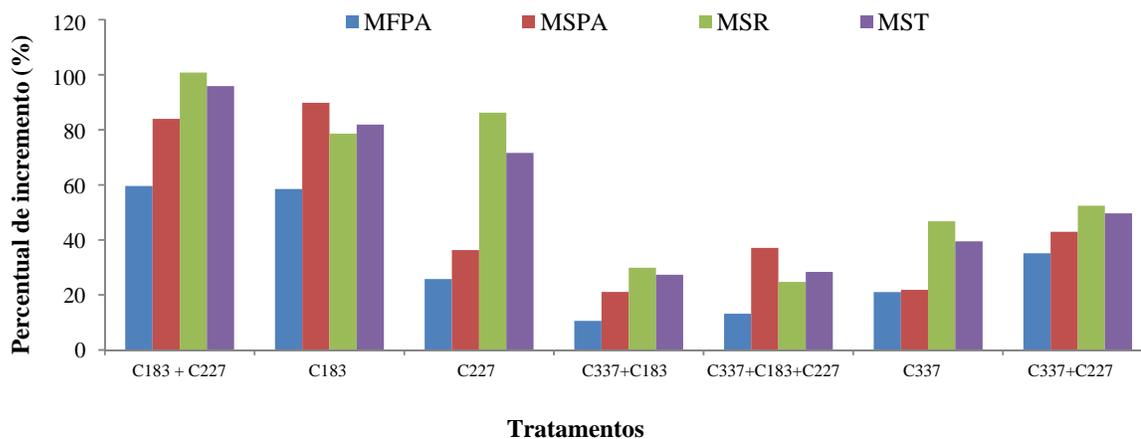


Figura 11. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre o percentual de incremento médio da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora o isolado C337 não tenha antagonizado C183 e C227 em meio King B (dados não apresentados), os dados sugerem que na rizosfera ele pode ter competido e antagonizado esses isolados, levando a um efeito negativo sobre as populações de C183 e C227, comprometendo o seu estabelecimento e sua capacidade de promover o crescimento da couve. A competição entre populações bacterianas é uma das causas da ausência de estabilidade de resposta das

plantas à inoculação com bactérias de vida livre e associadas. De acordo com McArthur (2009) quando diferentes populações que ocupam o mesmo nicho competem por recursos limitantes o resultado pode levar à eliminação de uma ou mais espécies.

A inoculação de dois microrganismos benéficos que atuam através de diferentes mecanismos pode apresentar efeito aditivo ou sinérgico promovendo o crescimento das plantas e a produção das culturas (BAREA et al., 2005). Embora o consórcio dos isolados C183+C227 não tenha sido melhor do que a inoculação de C183, em condições de campo é possível que se obtenha mais vantagem com a inoculação simultânea dos dois isolados.

5.10.2 Consórcio de rizobactérias e rizóbio

Foi avaliado o efeito sobre o crescimento da couve de folha var. Manteiga híbrida decorrente da inoculação de consórcio entre as estirpes de rizobactérias S3103 e R1132 classificadas através do seqüenciamento do gene 16S RNAr como *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., respectivamente e duas estirpes de rizóbio BR 3267 e BR 3299. O efeito da inoculação das estirpes isoladas ou dos consórcios sobre os valores absolutos da MSPA e MST das plantas de couve inoculadas foi praticamente nulo (**Tabela 16**). Porém, observa-se na **Tabela 17** que a inoculação com as estirpes S3103, BR3299 e BR3267 e seus respectivos consórcios proporcionaram incremento médio da MFPA em relação à testemunha em cerca de 30% não diferindo entre si, sendo superiores ao isolado R1132 e ao consórcio dos quatro isolados que não proporcionaram incremento dessa variável (**Figura 12A**). Quando o isolado S3103 foi consorciado com R1132 o incremento médio da MFPA foi de 56% sendo superior à inoculação com R1132, mas não diferiu da inoculação de S3103 em separado (**Tabela 16**, **Figura 12B**).

As estirpes S3103 e BR3299 também proporcionaram aumento da MSR em cerca de 100% não diferindo entre si. Porém, a co-inoculação dessas duas estirpes proporcionou um aumento de 176%, embora não significativamente diferente da inoculação dos isolados separadamente. Resultados semelhantes podem ser observados para a inoculação de S3103 com BR3267 e de S3103 com as duas estirpes de rizóbio utilizadas nesse ensaio.

Os isolados S3103 e BR3299 quando inoculados em consórcio com a estirpe R1132 mantiveram o efeito positivo sobre o crescimento das raízes não diferindo entre si. Os dois rizóbios consorciados não tiveram efeito significativo sobre as raízes, assim como o consórcio das quatro estirpes. É provável que no consórcio com as estirpes de rizóbios e as rizobactérias tenha ocorrido uma competição pelos recursos presentes nos exsudatos, como consequência

da ocupação de nichos comuns, se antagonizando e anulando o efeito benéfico sobre o crescimento das plantas. Pode também ter ocorrido que a redução acentuada da densidade de inóculo considerando cada isolado individualmente possa ter impedido que as populações se estabelecessem em densidade suficiente para promover o crescimento das plantas durante a condução desse ensaio.

Nesse ensaio, não foi confirmado o estabelecimento do isolado R1132 na rizosfera dessa variedade de couve. Essa estirpe pode ter sido incapaz de utilizar os compostos presentes nos exsudatos, apesar da capacidade saprofítica reconhecida para o grupo pseudomonas ou não tenha competido com a biota residente presente no solo sem autoclavagem. Aparentemente, a ausência de efeito demonstrada pela estirpe R1132 não interferiu com a resposta aos outros isolados quando em co-inoculação.

Tabela 16. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tratamento	MFPA (g)	MSPA* (g)	MSR (g)	MST* (g)
S3103	4,42 a	0,44	0,42 a	0,86
BR3299	4,31 a	0,40	0,41 a	0,81
BR3267	4,37 a	0,47	0,35 b	0,82
R1132	3,15 b	0,29	0,12 b	0,41
S3103+R1132	5,28 a	0,51	0,42 a	0,93
S3103+BR3267	4,58 a	0,47	0,52 a	0,99
S3103+BR3299	4,20 a	0,31	0,56 a	0,87
R1132+BR3299	4,76 a	0,46	0,45 a	0,91
R1132+BR3267	4,29 a	0,45	0,36 b	0,81
BR3267+BR3299	4,27 a	0,39	0,28 b	0,67
S3103+BR3267+BR3299	5,05 a	0,45	0,52 a	0,97
S3103+R1132+BR3299	4,68 a	0,54	0,32 b	0,86
S3103+R1132+BR3267	4,12 a	0,33	0,31 b	0,64
R1132+BR3267+BR3299	4,81 a	0,46	0,33 b	0,78
R1132+S3103+BR3267+BR3299	3,35 b	0,27	0,13 b	0,39
Testemunha	3,39 b	0,44	0,20 b	0,64
CV (%)	17,70	30,47	54,43	35,5

* Não houve diferença significativa

Tabela 17. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre o percentual de incremento médio da massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve em relação à testemunha sem inoculação.

Tratamento	MFPA	MSPA	MSR	MST
R1132	-7	-34	-40	-36
S3103	30	0	106	34
BR3299	27	-9	101	26
BR3267	29	6	73	27
S3103+BR3299	24	-30	176	35
S3103+BR3267	35	7	155	54
R1132+BR3299	40	5	121	41
S3103+R1132	56	16	105	44
BR3267+BR3299	26	-11	37	4
R1132+BR3267	27	2	74	25
S3103+BR3267+BR3299	49	3	155	51
S3103+R1132+ BR3267	22	-25	52	-1
S3103+R1132+ BR3299	38	23	57	34
R1132+BR3267+BR3299	42	4	60	22
R1132+S3103+BR3267+BR3299	-1	-39	-38	-39

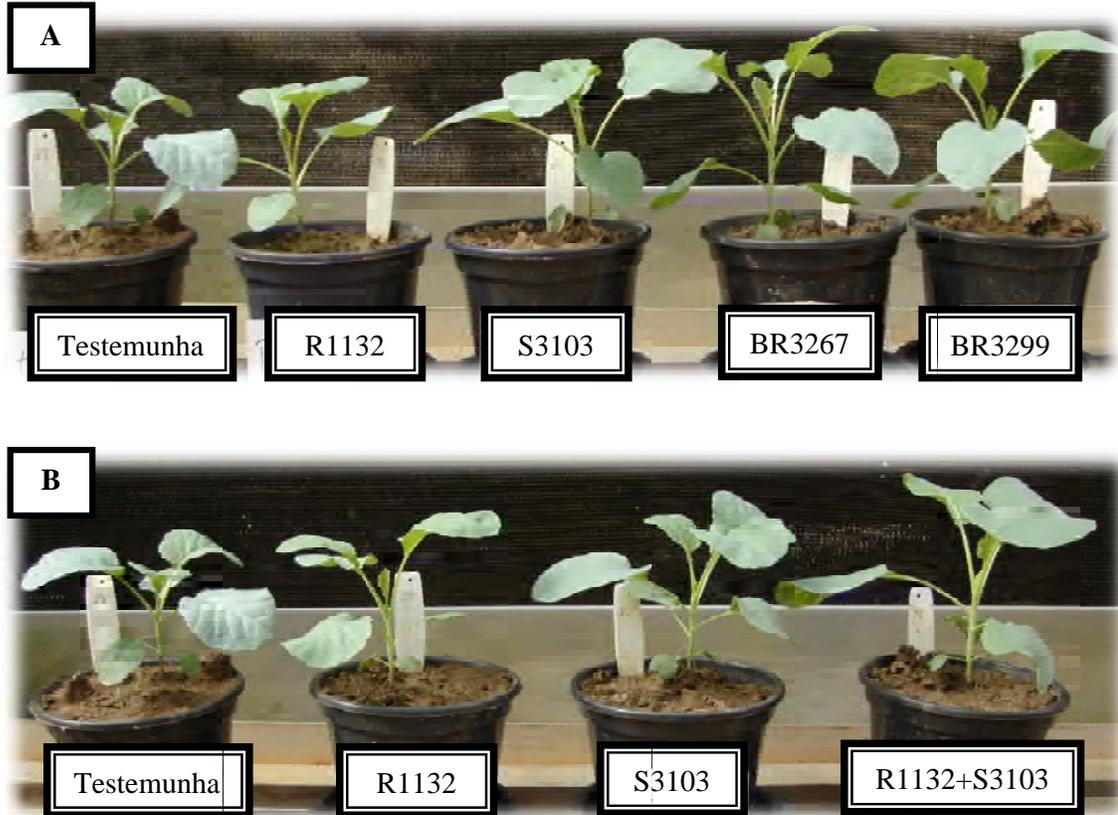


Figura 12. Efeito da inoculação de rizobactérias e rizóbios sobre o crescimento de couve de folha. A. rizobactérias: R1132 e S3103 e rizóbios: BR 3267 e BR 3299. B. Efeito das rizobactérias consorciadas.

Além da fixação do N atmosférico, rizóbios também promovem o crescimento de plantas através de mecanismos distintos, tais como a produção de AIA e a solubilização de P que podem ter contribuído para o efeito observado sobre o crescimento da couve (SINGH et al., 2011; SPAEPEN et al., 2009). Bactérias do grupo dos rizóbios vivem saprofiticamente no solo e na rizosfera e são estimulados pelos exsudatos radiculares aumentando sua densidade na superfície das raízes. Quando em vida livre, podem se multiplicar, enquanto as células que penetram nas raízes e infectam a planta perdem essa capacidade (MCARTHUR, 2009). O sucesso da inoculação com rizóbio é, portanto altamente dependente da atividade saprofítica dessas bactérias na rizosfera das plantas. Em diversos estudos com leguminosas, BPCPs, incluindo espécies de pseudomonas e bacilus têm sido consorciadas com rizóbios, porém pouco tem sido explorado do potencial de rizóbios para plantas não leguminosas. Já foi demonstrado aumentos na taxa de infecção das raízes, no número de nódulos, conteúdo de N

nos tecidos, biomassa das raízes, da parte aérea, vigor da planta, produção de grãos em alfafa, feijão, amendoim e grão de bico decorrentes da inoculação com rizóbio e outras espécies de BPCPs. (SINDHU et al., 2002; ROSAS et al., 2006). A co-inoculação de *P. striata* e *Rhizobium* sp. aumentou a nodulação de *Vigna radiata* e grão de bico, a disponibilidade de P no solo, biomassa seca e produção (WANI et al., 2007). O consórcio de estirpes MRX13, CRS55b e CRS68 de *Pseudomonas* sp. com a estirpe Ca181 isolada de *Mesorhizobium* sp. proporcionou maior acúmulo de biomassa das plantas, de nódulos e grãos em grão de bico (SINDHU et al., 2002). No estudo conduzido por STAJKOVIC et al. (2011) a co-inoculação de *R. phaseoli* e a estirpe Bx de *Bacillus* sp. e LG de *Pseudomonas* sp. proporcionou incremento na massa de matéria seca da parte aérea, conteúdo de P e N no feijão comum.

O presente estudo mostrou um efeito positivo das duas estirpes de rizóbio consorciadas com a estirpe S3103, especialmente sobre o sistema radicular, sugerindo que consórcios de rizóbios com outros grupos de rizobactérias também podem ser explorados para não leguminosas. Esses resultados também apontam a possibilidade de se investigar o consórcio da estirpe S3103 com BR3267 e BR3299 para maximizar a fixação biológica de N em leguminosas.

5.11 Promoção de crescimento e produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados

O ácido indol-3-acético (AIA) é o principal composto estudado com atividade auxínica e está associado a uma série de aspectos relacionados ao desenvolvimento e crescimento das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2009). A produção de AIA por rizobactérias propicia a interação com as plantas de forma benéfica ou deletéria (LOPER & SCHROTH, 1996). Nesse ensaio, foram escolhidos seis isolados fluorescentes caracterizados como pseudomonas que produziram diferentes níveis de AIA. Os isolados foram crescidos em meio suplementado com L-trp e aplicou-se 1 ml dessas suspensões contendo células bacterianas e AIA e compostos indólicos relacionados sobre as raízes da *Brassica oleracea* L. var. acephala, grupo Manteiga, cultivar híbrida Hi-Crop (sementes não tratadas).

Todos os isolados, independentemente da concentração de AIA detectada, proporcionaram aumento da MFPA, MSPA e MST das plantas inoculadas em comparação à testemunha sem inoculação, não diferindo entre si (**Tabela 18**). Também proporcionaram aumento da área foliar, sendo C3113, R1132 e S311 superiores aos isolados R223, C227 e C142 e à testemunha não inoculada.

Tabela 18. Produção de ácido indol-3-acético e compostos indólicos relacionados (AIA) e o efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca das raízes (MSR), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca total (MFT), área foliar (AF), comprimento da raiz principal (LR), número de raízes secundárias (RS), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) e área radicular (AR) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação.

Tratamento	AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MFPA (g)	MSPA (g)	AF (cm^2)	LR (cm)	RS (n)	AR (cm^2)	MFR (g)	MSR (g)	MFT (g)	MST (g)
C3113	87,2	2,79 a	0,22 a	86,61 a	19,80 a	62,40 a	3097,62 a	1,18 a	0,17 a	3,98 a	0,39 a
R1132	13,24	2,60 a	0,20 a	69,44 a	18,50 a	77,40 a	3576,96 a	1,05 a	0,17 a	3,65 a	0,37 a
S311	128,27	2,78 a	0,21 a	72,91 a	17,30 a	58,80 a	2931,55 a	0,74 b	0,13 a	3,52 a	0,34 a
C142	2,73	2,40 a	0,19 a	61,75 b	18,30 a	73,20 a	3100,19 a	0,89 a	0,13 a	3,29 a	0,32 a
R223	10,9	2,37 a	0,18 a	63,99 b	16,50 a	54,40 a	3114,13 a	0,67 b	0,17 a	3,03 b	0,35 a
C227	61,51	2,18 a	0,18 a	57,81 b	21,80 a	73,20 a	2217,94 a	0,66 b	0,13 a	2,84 b	0,31 a
TEST	0	1,56 b	0,12 b	39,78 c	21,10 a	42,80 a	1951,11 a	0,61 b	0,11 a	2,17 b	0,23 b
CV (%)	--	17,26	16,11	23,26	19,01	29,49	44,25	33,56	35,75	18,14	19,74
Prob (F)**	--	0,0012	0,0004	0,0030	0,2246	0,0982	0,4479	0,0211	0,3953	0,0014	0,0170

*Médias de cinco repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Prob (F) = Probabilidade exata de Fisher

Um efeito comum das auxinas produzidas por rizobactérias é a mudança na arquitetura do sistema radicular das plantas observando-se aumento no número de pêlos radiculares e das raízes laterais acompanhado de redução do comprimento da raiz principal (SPAEPEN et al., 2009). No estudo conduzido por Peyvandía et al. (2010), a formação e arquitetura do sistema radicular de microestacas de oliveira foram profundamente afetadas pelas estirpes P19 e P21 de *P. fluorescens* que foram superiores à aplicação do ácido indol-butírico comercial. Por outro lado, Remans et al. (2008) demonstraram que as respostas das raízes a doses crescentes de AIA foram positivamente correlacionadas com o número de raízes secundárias e com a biomassa da parte aérea e das raízes do feijoeiro crescendo sob baixos níveis de P em casa de vegetação. Quando os níveis de fósforo eram elevados a correlação desapareceu, mostrando que esse efeito também pode ser modulado por fatores ambientais. A arquitetura do sistema radicular das plantas sofre profundas modificações em resposta à deficiência de P conforme discutido por Desnos (2008). Quando a raiz principal encontra um baixo conteúdo de fósforo inorgânico seu crescimento é restringido devido à redução do crescimento celular e da atividade meristemática. Se a ausência de Pi for mantida cessa a atividade meristemática e provoca uma recirculação da auxina das células meristemáticas para células mais velhas da raiz provocando sua ramificação, o que pode se somar ao efeito do AIA produzido por rizobactérias nessas condições.

No presente estudo, embora os isolados C142, R1132 e C227 tenham proporcionado o maior número de raízes secundárias, as diferenças não foram significativas. Não foram observadas diferenças significativas na área das raízes, apesar dos valores obtidos para a inoculação com algumas estirpes (R1132, R223, C142 e C3113) serem mais de 50% àqueles obtidos para a testemunha. O aumento do sistema radicular é vantajoso para mudas de hortaliças porque pode ancorá-las mais rápido no solo, favorecer a obtenção de água e nutrientes, aumentando suas chances de sobrevivência (AHMED & SHAHAB, 2011). Os isolados C3113, R1132 e C142 incrementaram significativamente a MFR e, em conjunto com o isolado S311, proporcionaram aumento da MFT não diferindo entre si. Não se correlacionaram no presente estudo o nível de AIA produzido pelas bactérias com a diminuição no comprimento da raiz principal ($r = -0,0004$), nem com a área radicular ($r = 0,0187$) com o número de raízes secundárias ($r = 0,069$) ou com massa de matéria seca das ($r = -0,0572$) e fresca das raízes ($r = 0,1005$). Correlações maiores foram encontradas para a MFPA ($r = 0,4412$), MFT ($r = 0,2328$), MSPA ($r = 0,4931$) e área foliar ($r = 0,4283$). Resultados semelhantes foram encontrados por Ali et al. (2010). Sob condições axênicas, o AIA produzido por estirpes de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* mostrou correlação altamente significativa com o conteúdo de AIA nas raízes e nas folhas e com a massa de matéria fresca da parte aérea das plantas de *Vigna radiata*. No entanto, em solo sem autoclavagem não houve correlação com a promoção de crescimento da parte aérea e das raízes. No estudo conduzido por Loper & Schroth (1996), as baixas concentrações de AIA produzidas por BPCPs e altas concentrações produzidas por bactérias deletérias estão correlacionadas à promoção e inibição do crescimento, respectivamente, e enfatizam que as concentrações de AIA são determinantes para a inibição ou promoção do crescimento vegetal.

No presente estudo, foi realizada ainda uma comparação entre a resposta de cada um desses isolados e à aplicação de ácido indol-3-acético (AIA) sintético em concentração semelhante àquela produzida pelo isolado. Os resultados mostraram que a aplicação do AIA sintético proporcionou um efeito semelhante não diferindo da inoculação dos isolados C142, R223, C227 e C3113 (**Tabela 19**).

Tabela 19. Efeito da inoculação de rizobactérias fluorescentes e o equivalente em AIA sintético sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca das raízes (MSR), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca total (MFT), área foliar (AF), comprimento da raiz principal (LR), número de raízes secundárias (RS), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) e área radicular (AR) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições.

Tratamento	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MFT (g)	AF (cm ²)	LR (cm)	RS (N)	MSR (g)	MST (g)	AR (cm ²)
C142	2,40	0,87	0,19	3,29	61,75	16,50	54,40	0,17	0,35	3114,13
AIA (2,73 µg ml ⁻¹)	2,29	0,76	0,18	3,05	62,39	16,70	62,20	0,12	0,30	2879,92
Prob (F)*	0,750	0,400	0,690	0,612	0,951	0,960	0,400	0,129	0,216	0,710
R223	2,37	0,66	0,18	3,03	63,99	18,00	67,80	0,14	0,32	3014,22
AIA (10,9 µg ml ⁻¹)	2,02	0,61	0,17	2,64	51,98	19,50	54,40	0,12	0,29	3497,44
Prob (F)	0,317	0,674	0,918	0,376	0,219	0,508	0,190	0,472	0,467	0,620
R1132	2,60	1,04	0,20	3,65	69,44	18,50	77,40	0,18	0,38	3576,96
AIA (13,24 µg ml ⁻¹)	1,93	0,54	0,16	2,48	61,96	21,00	66,40	0,10	0,26	3478,51
Prob (F)	0,125	0,013	0,153	0,053	0,524	0,189	0,560	0,047	0,028	0,863
C227	2,18	0,66	0,18	2,84	57,81	21,80	73,20	0,13	0,31	2217,99
AIA (61,51 µg ml ⁻¹)	1,78	0,59	0,16	2,37	44,38	14,40	65,40	0,10	0,26	3278,63
Prob (F)	0,219	0,686	0,441	0,331	0,165	0,100	0,535	0,505	0,436	0,180
C3113	2,79	1,18	0,22	3,98	86,61	19,80	62,40	0,17	0,40	3097,62
AIA (87,2 µg ml ⁻¹)	2,30	0,75	0,18	3,06	60,15	18,30	73,20	0,14	0,31	3100,19
Prob (F)	0,230	0,300	0,169	0,240	0,130	0,400	0,370	0,550	0,340	0,990
S311	2,78	0,74	0,21	3,52	72,91	17,30	58,80	0,13	0,34	2931,55
AIA (128,27 µg ml ⁻¹)	1,92	0,61	0,16	2,53	47,96	15,70	58,20	0,14	0,29	2646,14
Prob (F)	0,060	0,170	0,059	0,069	0,053	0,356	0,953	0,831	0,350	0,797

*Prob (F) = Probabilidade exata de Fisher

Considerando as variáveis analisadas, dois isolados foram superiores à aplicação do AIA sintético, R1132 que proporcionou aumento das massas de matéria fresca e seca das raízes e total e S311 que incrementou a massa de matéria fresca e seca da parte aérea, massa fresca total e da área foliar. Nessas bactérias, além do AIA, outras substâncias com atividade auxínica devem também contribuir para a promoção do crescimento das plantas. Nesse estudo, a concentração de AIA e de uma mistura de compostos indólicos que também podem estimular o crescimento de plantas foi estimada com o reagente de Salkowski. Na via biossintética de AIA em bactérias a partir do triptofano outros intermediários também apresentam atividade auxínica. De modo a elucidar o resultado obtido, uma análise cromatográfica poderia determinar com maior acuidade quais os compostos presentes e qual a razão entre eles e o AIA. Em um estudo conduzido por Ali et al. (2009) demonstrou-se

grandes diferenças entre a quantidade de AIA detectada pelo método colorimétrico e pela cromatografia. A natureza dos compostos promotores de crescimento produzidos por bactérias não está ainda totalmente elucidada. No estudo desenvolvido por Ortiz-Castro et al. (2011) demonstrou-se que dipeptídeos cíclicos, tais como L-Pro-L-Val, L-Pro-L-Phe e L-Pro-L-Tyr, produzidos por *P. aeruginosa*, estão também envolvidos na modificação da arquitetura do sistema radicular de plântulas de *Arabidopsis*, tendo apresentado efeito semelhante à aplicação do AIA. Também já foi demonstrado que lactonas homoserinas, sinais de resposta do tipo *quorum sensing*, também podem estimular o crescimento das raízes. No isolado S311 que apresentou resposta superior à concentração similar de AIA sintético foi detectada a produção desse sinal. Também já foi relatado que a produção de ACC desaminase (AcDs) é um mecanismo importante pelo qual bactérias promovem o crescimento de plantas. A produção bacteriana de AIA pode estimular a síntese de etileno nas plantas que tem como precursor o ácido aminociclopropano (ACC). O etileno é produzido pelos vegetais em condições de estresse inibindo o alongamento das raízes, a senescência e a abscisão de órgãos vegetais. Uma hipótese que vem sendo muito discutida é a de que a produção de auxinas pelas bactérias estimula a produção de ACC pelas plantas que é por sua vez, excretado pelas raízes e desaminado pela AcDs produzida pelas bactérias liberando cetobutirato e amônia que são fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento bacteriano (GLICK et al., 2007). Taiz & Zeiger (2009) discutem que apesar da lista crescente de compostos que atuam como promotores de crescimento em vegetais, as auxinas e citocininas diferem dos demais porque são necessárias para a viabilidade, pois mutações que eliminam esses hormônios nas plantas são letais. Conforme discutido por Fosket (1994), no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, o balanço entre os reguladores AIA/ Citocinina, AIA/ giberelinas é mais importante do que o efeito individual propriamente dito. Dessa forma os resultados apresentados com os isolados R1132 e S311 sugerem que a produção de AIA ao aumentar o pool de auxinas na planta possivelmente alterou a razão entre esses hormônios.

Quanto à resposta observada nesse ensaio para o isolado R1132 (**Figura 13**) diferente do ensaio anterior e para S311 avaliado no ensaio II, quando não proporcionaram efeito sobre o crescimento da plantas de couve, sugere uma sensibilidade a fatores críticos, tais como estabelecimento nas raízes, competição com a microbiota residente e sobrevivência a estresses abióticos. Remans et al. (2008) mostraram que a inoculação da estirpe Sp245 de *Azospirillum brasilense* em duas linhagens parentais de feijão mostraram diferenças na resposta à inoculação, sendo que a promoção de crescimento ocorreu apenas em uma linhagem.

Kamilova et al. (2009) mostraram que o efeito de estirpes que promoveram o crescimento de plantas pode ser variável de acordo com a concentração de triptofano nos exsudatos radiculares. Kochar et al. (2011) mostraram que uma estirpe que superproduziu AIA inibiu as raízes somente quando triptofano foi adicionado ao meio de cultivo, não ocorrendo naturalmente. No estudo conduzido por Peyvandia et al. (2010), demonstrou-se que a habilidade de duas estirpes de *Pseudomonas* fluorescentes em proporcionar aumento do número de raízes adventícias em microestacas de oliveira foi dependente da adição de triptofano ao meio de cultivo e da densidade celular, pois quando inoculadas através de suspensões contendo 10^8 UFC ml^{-1} o efeito foi significativamente superior em comparação à aplicação de 10^5 UFC ml^{-1} . No presente estudo, ainda são necessárias mais avaliações, mas é possível que a adição de triptofano em veículos de inoculação contendo S311, R1132 e os outros isolados promotores de crescimento possa melhorar a consistência da resposta à inoculação dessas bactérias. Esse procedimento sugere que possivelmente a resposta ocorra em função da produção de AIA, de forma que em condições naturais, seja reduzida a dependência desse precursor apenas a partir dos exsudatos radiculares. Ainda há muito a se estudar para entender o papel do AIA produzido por essas bactérias na promoção do crescimento de plantas e qual a relação dessa característica com a eficiência dos isolados em condições de campo.

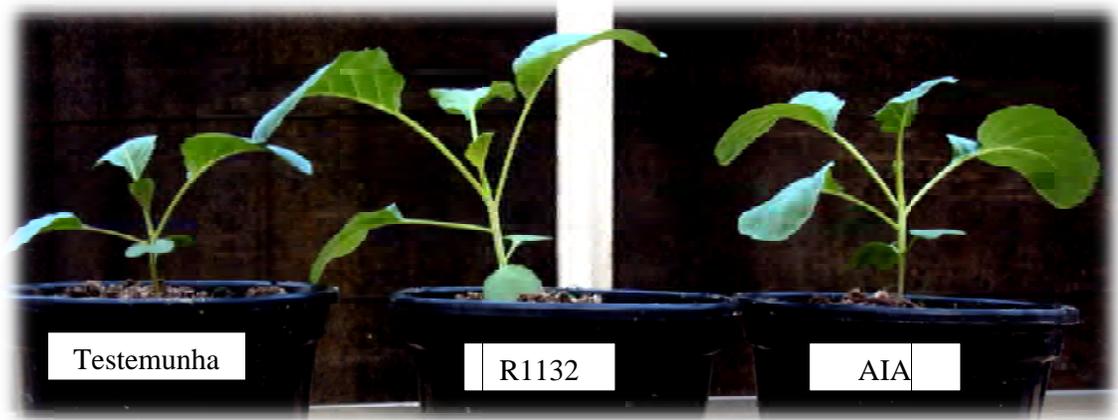


Figura 13. Efeito sobre o crescimento de plantas de couve de folha com a inoculação do isolado R1132 em comparação à testemunha e ao ácido indol-3-acético ($13,24 \mu\text{g ml}^{-1}$).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo transcendem a esse trabalho de tese porque são na realidade parte de um projeto que tem como objetivo desenvolver um inoculante para a promoção de crescimento de hortaliças contendo pseudomonas fluorescentes em sua formulação. A horticultura representa uma atividade agrícola importante para o País com importância social para o emprego de elevado número de mão-de-obra e segurança alimentar. No Brasil, o consumo de hortaliças pela população é um fator relacionado à renda, mas também à cultura, sendo o Rio de Janeiro um dos cinco estados que mais produzem hortaliças orgânicas e que possui o maior nível de consumo de hortaliças per capita do Brasil. Até o presente momento, identificaram-se doze isolados que proporcionaram aumento da biomassa da parte aérea e raízes das plantas de couve. A partir desse ponto etapas futuras ainda necessitam ser realizadas para o desenvolvimento do inoculante. Primeiro considera-se importante avaliar o potencial dessas rizobactérias para promover o crescimento de outras espécies olerícolas, pois a horticultura é caracterizada por uma diversidade de famílias botânicas que também podem se beneficiar da introdução desses isolados, inclusive consorciados com estirpes que atuem através de diferentes mecanismos de ação na promoção do crescimento vegetal, tais como os rizóbios e os bacillus. Com o uso de consórcios pode-se obter um efeito sinérgico ou mesmo uma melhoria na consistência da resposta ao uso de inoculantes dessas bactérias. Essa última questão é considerada chave para uma maior adoção de inoculantes contendo pseudomonas e outros grupos bacterianos para controle biológico ou promoção direta de crescimento. Condições ambientais influenciam a resposta da planta à inoculação e o estabelecimento da bactéria na rizosfera. A resposta à inoculação é mais freqüente em solos pobres com baixos níveis de nutrientes. Assim, pretende-se conduzir estudos em condições de campo para se estudar o efeito da interação entre esses isolados e níveis de fertilizantes minerais e orgânicos. Nessa linha, deverá ser definida a menor quantidade de adubo que pode ser aplicada em conjunto com o inoculante bacteriano que resulte em produtividade. Desse modo, espera-se obter resultados em condições de campo com maior consistência na resposta à inoculação e redução de custos, da dependência de insumos externos na propriedade agrícola e da poluição ambiental, que é o auge a que se pode chegar com o uso de inoculantes bacterianos. Uma questão importante será desenvolver veículo e tecnologia de aplicação para esses inoculantes. Nesse sentido, acredita-se que no Brasil ainda não se tem um número maior de inoculantes bacterianos porque apesar da identificação de isolados com potencial, pesquisas finalísticas visando à obtenção de

formulações de inoculantes que garantam a viabilidade das células bacterianas que sejam inócuos e biodegradáveis não são realizadas. Apesar disso, já se obteve um avanço expressivo, pois um veículo de inoculação com formulação polimérica mostrou que pode manter sob condições de temperatura ambiente por um período 150 dias, a viabilidade de pseudomonas em torno de 10^8 UFC ml⁻¹. Em função desses resultados, gerou-se um termo aditivo ao pedido de depósito de patente (Propriedade Intelectual 0506338-8). As bactérias nas formulações poliméricas quando diluídas em água, podem ser utilizadas para regar as bandejas de produção de mudas, já que boa parte das espécies hortícolas passa por uma fase em viveiros onde são semeadas em bandejas e depois transplantadas. A muda inoculada pode ir para o campo mais sadia, vigorosa e se estabelecer mais rapidamente. Previamente ao registro e comercialização desses inoculantes ainda será necessário avaliar a biossegurança dessas formulações, pois pseudomonas pertencem a um gênero que contém espécies que são patogênicas a seres humanos e animais e ainda patógenos oportunistas. Já foi demonstrado que isolados da mesma espécie de origem clínica diferem daqueles encontrados no solo e na rizosfera. Espera-se que essas bactérias sejam inócuas e possam ser livremente utilizadas na agricultura.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados do solo pós-cultivo de hortaliças foram distribuídos de acordo com o perfil bioquímico em seis grupos que se distinguiram em *P. putida*, *P. luteola*, *A.baumannii*, *B. cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*.
- a capacidade de formar biofilmes foi detectada em todos os isolados, em contraste a produção de sideróforos que foi mais frequente nos isolados da rizosfera em comparação aos isolados de solo pós-cultivo;
- em trinta e um por cento dos isolados foi detectada a produção de lactonas homoserinas, prevalecendo nos isolados de solo pós-cultivo;
- a capacidade de produzir ácido indol-acético e compostos indólicos relacionados em meio de cultivo contendo triptofano foi detectada na maioria dos isolados, sendo comum a todos os isolados da rizosfera;
- foi encontrada uma elevada proporção de isolados capazes de solubilizar fosfato de cálcio com baixa e média eficiência de solubilização independentemente da origem;
- foram selecionados 12 isolados que promoveram o crescimento de parte aérea e sistema radicular de plantas de couve de folha inoculadas sob condições de casa-de-vegetação;
- foi verificada variação percentual na resposta de promoção de crescimento obtida pela inoculação das plantas e quatro isolados (C183, C317, C1133 e S3103) proporcionaram aumento da biomassa das plantas em dois ensaios;
- os isolados que promoveram o crescimento da couve de folha foram classificados como *Pseudomonas* sp. sendo similares a *P. putida* e a *P. plecoglossicida*, exceto o isolado S3103 que se distinguiu dos demais e foi similar a *Bacillus* sp.;
- o consórcio dos isolados C183 e C227 não teve efeito sinérgico sobre o crescimento das raízes e da biomassa total das plantas inoculadas, mas foi superior à inoculação do isolado C227. O consórcio com o isolado C337 que não promoveu o crescimento anulou o efeito benéfico de C227 e C183 sobre o crescimento das plantas;
- o isolado S3103 mostrou efeito sobre o crescimento da couve Manteiga híbrida. O consórcio de S3103 e as duas estirpes de rizóbio BR3267 e BR 3299 incrementou o crescimento da parte aérea e das raízes em cerca de 150% os valores obtidos para testemunha não inoculada;
- não houve relação entre as concentrações crescentes de AIA produzido em meio de cultivo e a promoção do crescimento da couve. Todos os isolados promoveram o

crescimento das plantas, sendo que os isolados R1132 e S311 foram superiores à aplicação do ácido indol-acético sintético.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEMOYE, A.O.; KLOEPPER, J.W. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1-12, 2009.

AFZAL, I.; BASRA, S. IQBAL, A. The effect of seed soaking with plant growth regulators on seedling vigor of wheat under salinity stress. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry**, v.1, p.6–14, 2005.

AGROFIT (2011) Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/AGROFIT.html. Acesso em: 9 set. 2011.

AHMED, N.; SHAHAB, S. Phosphate solubilization: Their mechanism genetics and application. **The Internet Journal of Microbiology**, v.9, 2011.

ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the european situation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 329-341, 2006.

ALAMI, Y.; ACHOUAK, W.; MAROL, C.H.T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by exopolysaccharide producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3393–3398, 2000.

ALI, B.; SABRI, A.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1379-1384, 2010.

ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystem & Environment**, v. 74, p.19-31, 1999.

ANDERSEN, J. B.; KOCH, B.; NIELSEN, T. H.; SORENSEN, D.; HANSEN, M.; NYBROE, O; CHRISTOPHERSEN, C.; SORENSEN, J.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora ultimum*. **Microbiology**, 149:37-46, 2003.

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16s rRNA sequence. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v.50, p.1563–1589, 2000.

APS BIOLOGICAL CONTROL COMMITTEE. Commercial biocontrol products available in the U.S.A. for use against plant pathogens. Disponível em: <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/>. Acesso em: 4 jan.2011.

AREVALO-FERRO, C.; REIL, G.; GORG, A.; EBERL, L. Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.87–114, 2005.

ARORA, N.K.; EKTA, K.; HARE, J.H.O; SUN, C.K.; DINESH, K.M. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24:581-585, 2007

ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. **Trends in Biotechnology**, v.25, p.356-362, 2007.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1559-1570, 2010.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.2043-2050, 2000.

BATTLE, S.E.; RELLO, J.; HAUSER, A.R. Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, p.70–78, 2009.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.349-360, 2010.

BANO, A.; FATIMA, M. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas* spp. **Biology & Fertility of Soils**, v.45, p.405–413, 2009.

BASHAN, L.E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v.44, 938–947, 2008.

BAUER, W.D.; MATHESIUS, U.; TEPLITSKI. Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing. **ASM News**, 71, p.129-135, 2005.

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCON, R.; AGUILAR, C.A. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 1761–1778, 2005.

BAUDOIN, E.; LERNER, A.; MIRZA, M. S.; EL ZEMRANY, H. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology**, v.161, p.219-226, 2010.

BAYA, M.A., BOEHHING, R.S. AND RAMOS-CORMENZANA, A. Vitamin production in relation to phosphate solubilization by bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v.13, p.527-531, 1981.

BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SCHUMANN, P. ERLER, W.; BURGHARDT, J.; SEYFARTH, W. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.297–308, 1999.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P. Sideróforos: “uma resposta dos microorganismos”. **Química Nova**, v.25, p.1155-1164, 2002

BENNASAR, A.; MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. PseudomoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. **Microbiology**, v.10, p.118, 2010.

BERINGER, J.E.R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture **Applied Microbiology Biotechnology**, v.84, p.11–18, 2009.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p. 399-406, 1976.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.; DEL GALLO, M.; VISCA, P.; Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, v.140, p. 1069-1077, 1994.

BROWN, G. R.; SUTCLIFFE, I. C.; CUMMINGS, S. P. Reclassification of [*Pseudomonas*] *doudoroffii* (Baumann et al. 1983) into the genus *Oceanomonas* gen. nov. as *Oceanomonas doudoroffii* comb. nov., and description of a phenol-degrading bacterium from estuarine water as *Oceanomonas baumannii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.51, p.67–72, 2001.

BROWNE, P.; RICE, O.; MILLER, S.; BURKE, J., DOWLING, D.N.; MORRISEY, J.P.; O'GARA, F. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. **Applied Soil Ecology**, v.43, p.131-38, 2009.

CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, 311:1113-1116, 2006.

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; LUMYONG, S. SCREENING siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 25:1919–1928, 2009.

CHANDRA, S., CHOURE, K., DUBEY, R. C., & MAHESHWARI, D. K. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.124-130, 2007.

CHANG, W.S.; MORTEL, M.; NIELSEN, L.; GUZMAN, G.N.; LI, XIAOHONG; HALVERSON, L.J. Alginate production by *Pseudomonas spp. putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.8290–8299, 2007.

CHEN, L.; DICK, W.A.; STREETER, J.G.; HOITINK, H.A.T. Fe chelates from compost microorganisms improve Fe nutrition of soybean and oat. **Plant and Soil**, 200:139-147, 1998.

CHENG, Z.; PARK, E.; GLICK, B.R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas spp. putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.912–918, 2007.

CHOUHDARY, D.K.; PRAKASH, W.A.V.; JOHRI, B.N. Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. **Current Science**, v.97, p.170-179, 2009.

COLLAVINO, M.M.; SANBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A.; AGUILAR, M.O. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.727-738, 2010.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p.669-678, 2010.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environment Microbiology**, v.71, p.4951-4959, 2005.

COOK, R.J. Tell me again what it is that you do. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.1-23, 2007.

CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1637–1645, 2010.

CORRÊA, S. **Anuário brasileiro de hortaliças**. Santa Cruz do Sul, 2010. 88 p.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. **Microbial Biofilms**. Annual Review of Microbiology, v.49, p.711-745, 1995.

CURIE, C.; BRIAT, J.F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p. 183-206, 2003.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.16, p.799-806, 2007.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments, **Plant and Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p.401-422, 2007.

DEANGELIS et al. 2008 Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. Disponível em: <http://escholarship.org/uc/item/7hs4001x>. Acessado em: 4 set.2011.

DECHO, A.; NORMAN, R.S.. VISSCHER,P.T. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. **Trends in Microbiology**, v.18, p.73-80, 2010.

DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; SANDOR, P.; VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. **Current Microbiology**, v. 45, p. 250-254, 2002.

DE LA FUENTE, L.; MAVRODIA, D.V.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Utilization of trehalose, benzoate, valerate, and seed and root exudates by genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.2712–2722, 2007.

DESNOS, T. Root branching responses to phosphate and nitrate. **Current opinion in plant biology**, v.11, p. 82-87, 2008.

DIAS, A. **Rizobactérias associadas a hortaliças sob cultivo orgânico: caracterização e seleção para o biocontrole de fungos fitopatogênicos habitantes do solo.** 2008. 93f.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) –Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2429–2438, 1999.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiology of Plant**, v.31, p.861–864, 2009.

EGAMBERDIEVA, D.; BERG, G.; LINDSTRÖM, K.; RÄSÄNEN, L.A. Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of odder galega (*Galega orientalis* Lam.). **European Journal of Soil Biology**, v.46, p. 269-272, 2010.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acessado em: 7 set. 2011.

FEKETE, A.; FROMMBERGER, M.; ROTHBALLER, M.; LI, X.; ENGLMANN, M.; FEKETE, J.; HARTMANN, A.; EBERL, L.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p.455–467, 2007.

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, R.L.D.; AGUIAR-MENESES, E.L. Manejo ecológico de fitoparasitas, p. 273-322. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Ed.) **Agroecologia: princípios e práticas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 517 p.

FISCHER, S.E.; JOFRE, E. C.; CORDERO, P.V.; MANERO, F.J.; GUTIERREZ, M.G.B. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p.241–251, 2010.

FONSECA, M. C. C. **Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes num sistema integrado de produção agroecológica**. RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003.140p. (Tese de Doutorado defendida no curso de Fitotecnia)

FOSKET, D. *Plant growth and development: a molecular approach*. Academic Press Inc. San Diego, 1994. 580p.

FUHRER, T.; FISCHER, E.; SAUER, U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*, v.187, p.1581–1590, 2005.

GAMALERO, E.; BERTA, G.; MASSA, N.; GLICK, B.R.; LÍNGUA, G. Interactions between *Pseudomonas spp. putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. *Applied Microbiology*, v.108, p.236–245, 2009.

GARBEVA, P.; VEEN, J. A.; ELSAS, J. D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology & Ecology*, v.47, p.51-64, 2004.

GARRITY, G.M., LILBURN, T.G., COLE, J.R., HARRISON, S.H., EUZEBY, J., AND TINDALL, B.J. Taxonomic outline of the bacteria and archaea, Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees, 2007. Disponível em: [http://www.taxonomicoutline.org /index.php/toba/article/view/190/223_uma](http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/190/223_uma). Acessado em: 21 jan. 2010.

GE, Y.H.; PEI, D.L.; ZHAO, Y.H.; LI, W.W.; WANG, S.F.; XU, Y.Q. Correlation between antifungal agent phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *Current Microbiology*, v.54, p.277–281, 2007.

GEDDIE, J.L.; SUTHERLAND, I.W. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *Journal Applied of Bacteriology*, v.74, p.467–472, 1993.

GILLIS, M.; VANDAMME, P.V.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, v.60, p.407-438, 1996.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, v.251, p.1–7, 2005.

GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26:227–242, 2007.

GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 28, p.367-374, 2010.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied Environment and Microbiology**, v. 61, p.793-796, 1995.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1968–1977, 2007.

GRICHKO, V.P.; FILBY, B.; GLICK, B.R. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. **Journal of Biotechnology**, v.81, p.45–53, 2000.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p. 83-93, 2002.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopatology**, v. 41, p. 117–153, 2003.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, 2005.

HARA, F.A.D. S.; OLIVEIRA, L. A. D. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p.667-672, 2005.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p.463-471, 2008.

HARTMANN, A.; SCHMID, M, TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, v.321, P. 235-257, 2009.

HASELWANDTER, K; WINKELMANN, G. Siderophores of Symbiotic Fungi. **Soil Biology**, v.12, p.91-103, 2007

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v.216, p. 541–551, 2003.

HODGE, A.; BERTA, G.; DOUSSAN, C.; MERCHAN, F.; CRESPI, M. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil**, v.321, p.153-187, 2009.

HOFTE, M.; ALTIER, N.) Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. **Research in Microbiology**, v.161, p.464-471,2010.

IMLAY, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v.77, p.755–76, 2008.

JAMALI, F.; SHARIFI-TEHRANI, A.; LUTZ, M.P. ; MAURHOFER, M. Influence of host plant genotype, presence of a pathogen and coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* strains on the rhizosphere expression of hydrogen cyanide- and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in *P. fluorescens* biocontrol strain CHA0. **Microbial Ecology**, v.57, p.267–275, 2009.

JAYASUDHA,T.; RANGESHWARAN, R.; VAJID, N. V. Relationship between indole acetic acid production by fluorescent *Pseudomonas* and plant growth promotion. **Journal of Biological Control**, v.24, p.349–359, 2010.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TUMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v.7,p.459-471, 2005.

JUNI, E. **Genus *Acinetobacter***. In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, 425–437, 2005.

KACHLANY, S. C., S. B. LEVERY, J. S. KIM, B. L. REUHS, L. W. LION, AND W. C. GHIORSE. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas spp. putida* G7. **Environment Microbiology**, v.3, p.774–784, 2001.

KAI, M.; EVMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives in Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L. V.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; AZAROVA, T.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in

exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe**, v.19, p.250-256, 2006.

KAPSALIS, A.; GRAVANIS, F.; GOWEN, S. Involvement of phenazine-1-carboxylic acid, siderophores and hydrogen cyanide in suppression of *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. damping-off by *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.6, p. 168-171, 2008.

KAUSAR, R.; SHAHZAD, S.M.; ARSHAD, M.; ASHFAQ, M. A. Screening and evaluation of rhizobacteria containing acc-deaminase for growth promotion of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. **Journal of Agriculture Research**, v.47, p.237-247, 2009.

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

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Sustainable Agriculture**, v.27, p. 29-43, 2009.

KEITH, L. M.; BENDER, C. L. AlgT controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas spp. syringae*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.7176–7184, 1999.

KIMURA, O; RIBEIRO, R. L. D. Taxonomia do gênero *Pseudomonas*. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, 209-228, 1994.

KOCH, B.; NIELSEN, T.H.; SØRENSEN, D.; ANDERSEN, J.B.; CHRISTOPHERSEN, C.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; SØRENSEN, J.; NYBROE, O. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 4509–4516, 2002.

KOCHAR, M., UPADHYAY, A., & SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v.162, p. 426-435, 2011.

KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIERREZ, A.G.; GONZA LEZ, B.; GUTIERREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.1455-1466, 2011.

KRAVCHENKO, L.V.; AZAROVA, T.S.; MAKAROVA, N.M.; TIKHONOVICH, I.A. The effect of tryptophan of plant root metabolites on the phytostimulating activity of rhizobacteria. **Mikrobiologiya**, v.73, p.195-198, 2004.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, 787 p. 2005.

LEMANCEAU, P.; ROBIN, A.; MAZURIER, S.; VANSUYT, G. Implication of pyoverdines in the interactions of fluorescent pseudomonads with soil microflora and plant in the rhizosphere. **Soil Biology**, v.12, p.165-192, 2007.

LEWIN, R. How microorganisms transport iron? **Science**, 225:401-402, 1984.

LINDSAY, W.L.; SCHWAB, A.P. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.5, p.821-840, 1982.

LOH, J.; PIERSON, E.A.; PIERSON, L.S.; STACEY, G. Quorum sensing in plant-associated bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p.1-6, 2002.

LOPER, J. E.; GROSS, H. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **European Journal of Plant Pathology**, 119:265–278, 2007.

LOPER, J.E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid in root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386–389, 1996.

LUCON, C.M.M. **Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos**. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. DE (Ed.) *Controle Biológico*. Jaguariúna, São Paulo. Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 141-161.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.86, p.1–25, 2004.

LUGTENBERG, B.; CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p.373–383, 2002.

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

LYNCH, J. M. **Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil.** In: Lynch J M (ed). *The Rhizosphere*. Wiley, Nova York, 1990, p.1-10.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v.31, p. 589-597, 2007.

MATILLA, M. A.; ESPINOSA-URGEL, M.; RODRIGUEZ-HERVA, J. J.; RAMOS, J. L.; RAMOS-GONZALEZ, M. I. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. **Genome Biology**, v. 8, p.179, 2007.

MARTINS, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. 1996. 213p.Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MARULANDA, A.; BAREA, J.M.; AZCON, R. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. **Journal of Plant Growth Regulating**, v.28, p.115–124, 2009.

MATTHIJS, S.; TEHRANI, K.A.; LAUS, G.; JACKSON, R.W.; COOPER, R.M.; CORNELIS, P. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 425–434, 2007.

MAZZOLA, M.; FUNNELL, D.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Wheat cultivar-specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonas species from resident soil populations, **Microbial Ecology**, 48: 338–348, 2004.

MCARTHUR, J.V. *Microbial ecology: an evolutionary approach*. Academic Press. 2006. 415p. Academic Press San Diego

MESSIHA, N. A. S.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; FARAG, N. S.; ABDALLAH, S. A.; JANSE, J. D.; VAN BRUGGEN, A. H. C. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 3, p. 211–225, 2007.

MEYER, J.M.; ABDALLAH, M.A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification, and physiochemical properties. **Journal of General Microbiology**, v.107, p.319–328, 1978.

MEYER, J.M.; GRUFFAZ, C.; RAHARINOSY, V.; BEZVERBNAYA, I.; SCHAFFER, M.; BUDZIKIEWIC, H. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. **Biometals**, v.21, p.259–271, 2008.

MILLER, K.J.; WOOD, J.M. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.101–136, 1996.

MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 55:165-199, 2001.

MINKWITZ, A.; BERG, G. Comparison of antifungal activities and 16s ribosomal dna sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 139-145, 2001.

MOCKAITIS, K.; ESTELLE, M. Auxin Receptors and plant development: a new signaling paradigm. **Annual Review of Cell and Development Biology**, 24:55–80, 2008.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

NAGARAJKUMARA, M.; JAYARAJ, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; BHASKARANA, R.; VELAZHAHAN, R. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v.160, p.291-298, 2005.

NEILANDS, J.B. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, v.1, p.27-46, 1981.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.271–309, 2004.

NEVES, M. C. P.; GUERRA, J. G. M.; CARVALHO, S. R.; ALMEIDA, D. L. DE, RIBEIRO, R .DE L. D. **Sistema Integrado de Produção Agroecológica ou Fazendinha Agroecológica do Km 47**. AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (ed). In: Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura sustentável, 1st edn. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 2005. pp. 147-169.

NIELSEN, M. N.; SORENSEN, J. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere **Applied Environment Microbiology**, v.64, p.3563-3569, 1998.

NISHIMORI, E.; KITA-TSUKAMOTO, K.; WAKABAYASHI, H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.50, p.83-89, 2000.

NOTZ, R.; MAURHOFER, M.; DUBACH, H.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Fusaric acid producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2229–2235, 2002.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; SCHÄFER, M.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Amino acids, iron, and growth rate as key factors influencing production of the pseudomonas putida BTP1 benzylamine derivative involved in systemic resistance induction in different plants. **Microbial Ecology**, v.55, p.280–292, 2008.

ORTIZ-CASTRO, R.; DIAZ-PEREZ, C.; MARTINEZ-TRUJILLO, M.; RÍO, R.E.; CAMPOS-GARCÍA, F.; LOPEZ-BUCIO, J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. **PNAS**, v.108, p.7253-7258, 2011.

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R. & DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.23, p. 333–339, 1973.

PALLERONI, N. J. **Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984.** In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 141–199, 1984.

PALLERONI, N. J. **Genus I. *Pseudomonas*.** In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Part B: The Proteobacteria. Springer, New York, pp. 323–379, 2005.

PALLERONI, N.J., **Genus IX. *Stenotrophomonas*.** In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Part B: The Proteobacteria. Springer, New York, pp. 323–379, 2005.

PARK, K.H.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF 15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p. 222-228, 2009.

PATEL, D.K.; MURAWALA, P.; ARCHANA, G.; KUMAR, G.N. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. **Bioresource Technology**, v.102, p.3055-3061, 2011.

PATTEN, C.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002.

PEIX, A.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; VELAZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.1132-1147, 2009.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, ZAMUDIO-RIVERA, R.L.S.; FERNÁNDEZ, F.J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, p.127–131, 2007.

PEYVANDIA, M.; FARAHANIB, M. F.; HOSSEINI, M.Z.; NOORMOHAMADID, S.A.; ASGHARZADEE, A. *Pseudomonas* fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. **International Journal of Plant Production**, v.4, p.63-66, 2010.

PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. **Naturwissenschaften**, v.95, p.1-16, 2008.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur, 1998, 159p.

PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T. F.; ROUWS, L. F. M.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; RIBEIRO, R.L. D. Caracterização morfofocultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.284-293, 2010.

PIROMYOU, P.; BURANABANYAT, B.; TANTASAWAT, P.; TITTABUTR, P. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p. 44-54, 2011.

PLIEGO, C.; RAMOS, C.; DE VICENTE, A.; CAZORLA, F. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. **Plant and Soil**, v.340.p.505-520, 2010.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.773-777, 2008.

PRASHANT, S.; MAKARAND, R.; BHUSHAN, C.; SUDHIR, C. Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 6-12, 2009.

RACHID, D.; AHMED, B. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p. 697-702, 2005.

RAD, U.; KLEIN, P.I.; DOBREV, J.K.; ZAZIMALOVA, E.; FEKETE, A.; HATMANN, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; DURNER, J. Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. **Planta**, v.229, p.73-85, 2008.

RAJKUMAR, M.; ANORIHARU, E.; PRASAD, M.; NARASIMHA, V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction **Trends in Biotechnology**, v.28,142-149, 2010.

REIS, V.M.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G.S. **Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agrônômica**. Comunicado técnico. Seropédica: Embrapa, 2009. 4p. (Documentos 118).

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGH, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p.44-54, 2011.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; VESSELY, S.; SHAH, S.; GLICK, B.R. Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* spp. strain on growth of nontransformed and transgenic canola plants. **Current Microbiology**, v.57, p.170–174, 2008.

ROSAS, S.B.; JAVIER, A.A.; ROVERA, M.; CORREA, N.S. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia–legume symbiosis. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.3502-3505, 2006.

ROKHBAKHSH-ZAMIN, F. D.; SACHDEV, N.; KAZEMI-POUR, A.; ENGINEER, K. R. ; PARDESI, S.; ZINJARDE, P. K. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.556-566, 2011.

ROVIRA, A D.; ELLIOT, L. F.; COOK, R. J. **The impact of cropping systems on rhizosphere organisms affecting plant health**. In: Lynch, J.M. (Ed.) *The Rhizosphere*, 1990. 458p.

RUMBERGER, A.; MARSCHNER, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and bacterial community composition in the rhizosphere of field-grown canola. **Functional Plant Biology**, v.31, p. 623–631, 2004.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. da; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 34-49, 2004.

RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J.A. A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 281- 335 (2005).

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; SAEED, B.A. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.635–648, 2007.

SALMAN, M., Determination of antibiotic activity on plasmids from fluorescent pseudomonads isolates CW2, WB15 and WB52 against pre emergence damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in cucumber. **Biological Control**, v.53, p.161-167, 2010.

SANDHYA, V.; ALI, S.K.Z ; GROVER, M.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas spp. putida* strain GAP-P45. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.17–26, 2009.

SCHLEIFER, K.H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, p.533–542, 2009.

SCHWIEGER, F. ; TEBBE, C.C. A new approach to utilize PCR- single –strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p. 4870-4876, 1998.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.140, p.47-56, 1986.

SEGERS, P.; VANCANNEYT, M.; POT, B.; TORCK, U.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DE VOS, P. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb.

nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v.44, p.499–510, 1994.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M.; ZAHIR, A. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.79, p.147–155, 2008.

SHANMUGAIAH,V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.703–711, 2010.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic Applied Microbiology**, v.33, p.269-274, 2010.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, 1615–1623, 2002.

SILBY, M.W.; WINSTANLEY, C.; GODFREY, S.A.C.; LEVY,S.B.; ROBERT, W.J. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, p.652-680, 2011.

SILVA, M.F.D.; OLIVEIRA, P. J. D.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1437-1443, 2009.

SINDHU, S.S.; SUNEJA, S.; GOEL, A.K.; PARMAR, N.; DADARWAL, K.R. Plant growth promoting effects of *Pseudomonas* sp. on coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* strain under sterile and “wilt sick” soil conditions. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.57-64, 2002.

SINGH, J.S.; PANDEY, V.C.; SINGH, D.P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.140, p.339–353, 2011.

SNEH B, JABAJI-HARE S, NEATE S, DIJST G, EDS. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, the Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**, 67–75, 1996.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.D.S.; MELO, A.M.T.D.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.225-234, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; DAS, F.; LUYTEN, E.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. **FEMS Microbiology Letters**, v.291, p.195-200, 2009.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; NAZARET, S.; OKON, Y.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology**, v. 161, p.219-226, 2010.

SPIERS, A.J., BUCKLING, A., RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, 146: 2345–2350, 2000.

STAJKOVIC, O.; DUSICA, D.; DRAGANA, J.; DORDE, K.; KUZMANOVIC, N.R.; JELENA, K. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, 2011.

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v.43, p.159-271, 1966.

STRIGUL, N.S.; KRAVCHENKO, L.V. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental Modelling & Software*, 21:1158-1171, 2006.

SUÁREZ-MORENO, Z.R.; CABALLERO-MELLADO, J.; COUTINHO, B.G.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; JAMES, E.K.; VENTURI, V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated burkholderia. **Microbial Ecology**, 2011.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M.S.; ANGELINI, J.G.; TONELLI, M.L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v.329, p.421–431, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4a ed. Artmed, Porto Alegre, 2009. 820p.

TORTORA, G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 8ª. Ed. Artmed, São Paulo, 2005. 920p.

TRUU, J.; TALPSEP, E.; HEINARU, E.; STOTTMEISTER, U.; WAND, H.; HEINARU, A. Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. **Journal of Microbiological Methods**, v.36, p.193-201, 1999.

TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A AND NETRUSOV A I Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology**, v.74, p.46-53, 2005.

VAN DILLEWIJN, P. What gets turned on in the rhizosphere? **Microbiology Biotechnology**, v.1, p.341-342, 2008.

VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A.L.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**. v.96, p.177-184, 2004.

VIEIRA, S. **Análise de variância**. Atlas, São Paulo, 2006. 204p.

VISCA, P.; FRANCESCO, I.; LAMONT, L.L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 22-30, 2006.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, D. COPLIN, D. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.455–482, 2003.

VYAS, P.; GULATI, A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. **BMC Microbiology**, v.9, p.174, 2009.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. **Acta Agronomica Hungarica**, v.55, p.315-323, 2007.

WEI JIN, C.; LI, G.; XIN, X.; ZHENG, S.J. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. **Annals of Botany**, v.105, p.835–841, 2010.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Joint FAO/WHO (2004) Workshop on fruit and vegetables for health. Disponível em: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit_vegetables_report.pdf. Acessado em: 4 Jan.2011

WILLEMS, A.; FALSEN, E.; POT, B.; JANTZEN, E.; HOSTE, B.; VANDAMME, P.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J.; *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.384–398, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221–271, 1987.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; ARAKAWA, M. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia*

solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, 39(11): 897-904, 1995.

YAMADA, T. The role of auxin in plant –disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.253-73, 1993.

YAN, AN; HUANG, XIANQING; LIU HAIMING; DONG DEXIAN; ZHANG DABING; ZANG, XUEHONG; XU, YUQUAN. An rhl-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. **Microbiology**, v.153, p.16-28, 2007.

YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v.14, p.1-4, 2008.

YAO, L.; WU, Z.; ZHENG, Y.; KALEEM, I.; CHUN, L. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas* spp. putida Rs-198 on cotton. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.49-54, 2010.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA microbiano**. Seropédica: Embrapa, 2004. 24p. (Documentos 171).

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* fluorescentes associadas à cultura de couve: influência da adubação. **Revista Caatinga**, v.24, p.20-27, 2011.

ZAIDI, A; KHAN, M.S.; AHMED, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Microbiology and Immunology**, v.56, p.263-284, 2009

ZHAN, Q.S. Microbiological diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings. **Microbiological Research**, article in press, 2011.

Anexo A - Origem e caracterização bioquímica de isolados fluorescentes obtidos a partir de solo de canteiro pós-cultivo de hortaliças sob sistema orgânico. identificação com o KIT API 20NE (Biomérieux) de rizobactérias fluorescentes isoladas a partir da rizosfera de hortaliças cultivadas sob sistema orgânico. ID = percentual de identificação, T = índice t; testes: NIT= redução de nitrato a nitrito ou azoto; TRP = degradação do triptofano; GLU = fermentação da glicose; ADH = produção de arginina dihidrolase; URE = produção de urease; ESC = hidrólise da esculina; GEL = hidrólise da gelatina; PNPG = p-nitrofenil-b-galactopiranosidase; GLU = utilização da D-glicose; ARA = arabinose; MNE = manose; MAN= manitol; NAG = n-acetil-glicosamina; MAL = maltose; GNT = gluconato de potássio; CAP = caprato; ADI = adipato; MLT = malato; CIT = citrato de trisódio; PAC = ácido fenil-acético.

Isolado	Taxon	ID	T	NIT	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
AL 27	<i>P. putida</i>	99,8	0,81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
AL 25	<i>P. putida</i>	84,8	0,77	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
AL 164	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CO26	<i>P. putida</i>	84,8	0,77	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
CO27	<i>P. putida</i>	84,8	0,77	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
CO28	<i>P. putida</i>	99,8	0,81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CO29	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CO31	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CO34	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CO163	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CO210	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CE31	<i>P. putida</i>	99,6	0,49	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CE32	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CE33	<i>P. putida</i>	84,2	0,49	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CE44	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU23	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU25	<i>P. putida</i>	97,1	0,51	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
RU26	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU27	<i>P. putida</i>	99,8	0,81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
RU29	<i>P. putida</i>	99,8	0,81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

RU34	<i>P. putida</i>	99,5	0,83	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
RU38	<i>P. putida</i>	99,8	0,83	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
RU 164	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU210	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU212	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
SA 21	<i>P. putida</i>	99,8	0,81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
SA 24	<i>P. putida</i>	99,5	0,83	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
SA 25	<i>P. putida</i>	0,2	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
SA32	<i>P. putida</i>	99,5	0,83	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
SA34	<i>P. putida</i>	28,4	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
AL 21	<i>P. putida</i>	28,4	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
AL 24	<i>P. putida</i>	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
AL 29	<i>P. putida</i>	95,3	0,51	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
RU35	<i>P. luteola</i>	88,9	0,44	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
RU83	<i>P. luteola</i>	41,3	0,31	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
SA33	<i>P. luteola</i>	99,5	0,23	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
AL 124	<i>A. baumannii</i>	97	0,56	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AL 83	<i>A. baumannii</i>	97,6	0,41	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AL 114	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CO23	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CO41	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CO42	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CO133	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CE21	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
RU31	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
RU42	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
RU 103	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
RU211	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
RU213	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

RU218	<i>A. baumannii</i>	99,8	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CE43	<i>S. maltophilia</i>	99,9	0,8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	
RU354	<i>S. maltophilia</i>	99,8	0,48	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	
AL84	<i>B. cepacia</i>	99,9	0,55	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CO184	<i>B. cepacia</i>	99,9	0,41	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CE45	<i>B. cepacia</i>	98,2	0,3	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AL 32	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AL 73	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CO24	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CO33	<i>ni</i>	0	0	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CO212	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RU22	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RU36	<i>ni</i>	0	0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU53	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RU214	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RU217	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RU224	<i>ni</i>	0	0	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RU334	<i>ni</i>	0	0	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RU344	<i>ni</i>	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SA31	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
AL 33	<i>ni</i>	0	0	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Anexo B - Biossíntese de compostos indólicos por bactérias fluorescentes obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Médias de três repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isolado	Origem	Abs ($\lambda=600$ nm)	Abs ($\lambda=540$ nm)	AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$ UDO)
S313	Rizosfera	2,18	2,53	887,65 A	407,18 A
S373	Rizosfera	2,07	2,10	831,35 B	401,62 A
R123	Rizosfera	2,24	0,71	269,27 D	120,21 B
S324	Rizosfera	1,27	0,36	130,81 I	103,00 C
R133B	Rizosfera	1,00	0,28	100,31 L	100,31 C
S353	Rizosfera	1,05	0,28	102,00 L	97,14 C
CO133	Solo	2,55	0,62	235,27 F	92,26 D
A329	Rizosfera	2,47	0,57	225,66 G	91,36 D
C316	Rizosfera	0,36	0,10	31,80 Q	88,33 D
C237	Rizosfera	4,09	0,88	343,63 C	84,02 E
CE21	Solo	1,67	0,38	138,85 I	83,15 E
R1102	Rizosfera	1,48	0,33	121,34 J	81,98 E
S241	Rizosfera	1,48	0,31	112,38 K	75,93 F
AL84	Solo	3,86	0,58	248,25 E	64,31 G
S311	Rizosfera	1,34	0,24	85,78 M	64,02 G
R171	Rizosfera	1,75	0,31	111,60 K	63,77 G
RU27	Solo	2,56	0,38	139,76 I	54,59 H
CO23	Solo	1,49	0,22	79,68 M	53,48 H
S1112	Rizosfera	1,20	0,21	63,83 N	53,19 H
C326	Rizosfera	1,14	0,17	58,92 O	51,68 H
CO33	Solo	2,39	0,35	115,03 K	48,13 I
C142	Rizosfera	1,24	0,18	59,18 O	47,73 I
CO26	Solo	2,14	0,28	99,93 L	46,69 I
AL25	Solo	2,72	0,34	123,93 J	45,56 I
R166	Rizosfera	1,80	0,22	78,77 M	43,76 I
A263	Rizosfera	1,90	0,23	82,67 M	43,51 I
C354	Rizosfera	1,20	0,15	52,17 P	43,48 I
R142	Rizosfera	1,20	0,15	52,17 P	43,48 I
RU22	Solo	4,50	0,52	194,78 H	43,28 I
SA32	Solo	1,25	0,16	53,60 O	42,88 I
R153	Rizosfera	1,84	0,22	78,77 M	42,81 I
C112	Rizosfera	1,80	0,21	75,14 M	41,74 I
RU218	Solo	3,27	0,37	135,48 I	41,43 I
A242	Rizosfera	1,30	0,17	53,14 P	40,88 J
C1103	Rizosfera	2,13	0,24	85,52 M	40,15 J
S231	Rizosfera	3,29	0,36	131,72 I	40,04 J
C1143	Rizosfera	2,95	0,27	118,10 K	40,04 J
C317	Rizosfera	1,56	0,18	62,42 O	40,02 J
C161	Rizosfera	2,68	0,29	105,38 L	39,32 J
R3142	Rizosfera	1,83	0,20	70,86 N	38,72 J
S312	Rizosfera	1,33	0,15	49,84 P	37,47 J
C363	Rizosfera	2,65	0,27	99,15 L	37,41 J
CO41	Solo	1,26	0,14	47,11 P	37,39 J
RU211	Solo	1,73	0,18	64,24 N	37,13 J
R3132	Rizosfera	2,03	0,21	72,93 N	35,93 J
C162	Rizosfera	3,04	0,30	109,01 K	35,86 J

C233	Rizosfera	2,82	0,25	100,17	L	35,52	J
CO34	Solo	3,81	0,37	135,09	I	35,46	J
RU217	Solo	3,18	0,30	107,45	K	33,79	K
A383	Rizosfera	2,03	0,19	68,13	N	33,56	K
RU354	Solo	2,08	0,20	69,69	N	33,50	K
CO184	Solo	2,28	0,21	74,88	M	32,84	K
RU34	Solo	3,47	0,31	112,90	K	32,54	K
C335	Rizosfera	1,90	0,18	60,87	O	32,03	K
R322	Rizosfera	2,08	0,19	65,93	N	31,70	K
S1122	Rizosfera	1,08	0,11	33,88	Q	31,37	K
S211	Rizosfera	1,94	0,17	57,88	O	29,84	K
R192	Rizosfera	1,74	0,15	51,78	P	29,76	K
R163	Rizosfera	1,73	0,15	51,39	P	29,71	K
C183	Rizosfera	1,99	0,17	59,05	O	29,67	K
CE32	Solo	2,56	0,21	75,79	M	29,61	K
C227	Rizosfera	2,51	0,21	73,71	M	29,37	K
C315	Rizosfera	2,65	0,22	77,09	M	29,09	K
R173	Rizosfera	2,25	0,19	65,02	N	28,90	K
C267	Rizosfera	1,83	0,15	52,82	P	28,86	K
SA21	Solo	3,81	0,30	107,84	K	28,30	K
A161	Rizosfera	2,00	0,16	56,32	O	28,16	K
R132	Rizosfera	2,93	0,23	81,37	M	27,77	K
CE43	Solo	2,73	0,21	75,53	M	27,67	K
C366	Rizosfera	2,28	0,18	62,03	O	27,21	L
R146	Rizosfera	2,04	0,16	55,29	O	27,10	L
R1132	Rizosfera	2,67	0,20	72,16	N	27,02	L
R133	Rizosfera	3,92	0,29	105,89	L	27,01	L
C332	Rizosfera	1,31	0,11	35,17	Q	26,85	L
C337	Rizosfera	2,05	0,16	54,64	O	26,65	L
C152	Rizosfera	2,58	0,20	68,65	N	26,61	L
C193	Rizosfera	1,84	0,14	48,80	P	26,52	L
C346	Rizosfera	2,32	0,18	61,00	O	26,29	L
R143	Rizosfera	2,27	0,17	56,97	O	25,10	L
C3113	Rizosfera	2,23	0,16	55,16	O	24,73	L
CO42	Solo	3,53	0,24	86,30	M	24,45	L
S383	Rizosfera	1,86	0,14	45,17	P	24,28	L
A1142	Rizosfera	1,20	0,09	28,94	Q	24,12	L
C312	Rizosfera	3,31	0,22	78,51	M	23,72	L
S166	Rizosfera	2,71	0,18	63,98	N	23,61	L
RU31	Solo	3,00	0,20	70,08	N	23,36	L
C1133	Rizosfera	2,48	0,17	57,88	O	23,34	L
RU213	Solo	3,24	0,21	74,49	M	22,99	L
CO29	Solo	3,03	0,20	68,65	N	22,66	L
C1113	Rizosfera	2,48	0,16	55,81	O	22,50	L
R152	Rizosfera	1,42	0,10	31,54	Q	22,21	L
RU164	Solo	4,50	0,28	99,67	L	22,15	L
C323	Rizosfera	2,22	0,15	49,06	P	22,10	L
CO212	Solo	2,22	0,14	48,54	P	21,86	L
C373	Rizosfera	2,42	0,15	52,56	P	21,72	L
RU103	Solo	3,87	0,23	80,85	M	20,89	M
S342	Rizosfera	1,53	0,10	31,93	Q	20,87	M
RU224	Solo	4,98	0,32	102,00	L	20,48	M
C117	Rizosfera	2,52	0,15	51,13	P	20,29	M
CO31	Solo	3,89	0,22	78,00	M	20,05	M

RU25	Solo	3,50	0,20	69,69	N	19,91	M
C247	Rizosfera	2,92	0,17	57,36	O	19,64	M
C325	Rizosfera	2,56	0,15	49,19	P	19,21	M
CE44	Solo	3,57	0,16	66,88	N	18,73	M
S113	Rizosfera	2,09	0,12	38,68	Q	18,51	M
C393	Rizosfera	2,58	0,14	46,59	P	18,06	M
C257	Rizosfera	3,90	0,20	69,30	N	17,77	M
C122	Rizosfera	2,73	0,14	48,15	P	17,64	M
AL27	Solo	3,33	0,19	58,20	O	17,48	M
CE31	Solo	2,88	0,15	50,23	P	17,44	M
RU212	Solo	4,53	0,22	77,87	M	17,19	M
SA34	Solo	3,17	0,16	53,73	O	16,95	M
RU26	Solo	2,24	0,12	37,77	Q	16,86	M
RU29	Solo	3,38	0,17	56,97	O	16,86	M
S263	Rizosfera	4,03	0,19	67,61	N	16,78	M
AL164	Solo	1,88	0,10	31,54	Q	16,78	M
A171	Rizosfera	4,08	0,19	65,93	N	16,16	M
S1132	Rizosfera	3,80	0,17	59,57	O	15,68	M
SA33	Solo	4,31	0,19	65,80	N	15,27	M
S142	Rizosfera	1,48	0,07	21,16	Q	14,30	N
A1141	Rizosfera	2,00	0,09	28,56	Q	14,28	N
C376	Rizosfera	2,63	0,12	37,51	Q	14,26	N
SA31	Solo	4,38	0,21	60,53	O	13,82	N
SA24	Solo	3,25	0,13	44,65	P	13,74	N
SA25	Solo	4,83	0,19	65,93	N	13,65	N
RU36	Solo	4,32	0,17	58,53	O	13,55	N
R223	Rizosfera	2,54	0,11	34,26	Q	13,49	N
CO28	Solo	4,21	0,16	55,81	O	13,26	N
CO163	Solo	3,58	0,16	46,91	P	13,10	N
AL114	Solo	3,49	0,14	45,55	P	13,05	N
A314	Rizosfera	2,57	0,13	32,91	Q	12,80	N
S173	Rizosfera	2,20	0,09	28,17	Q	12,80	N
RU334	Solo	5,18	0,19	65,80	N	12,70	N
RU214	Solo	4,23	0,15	52,82	P	12,49	N
C356	Rizosfera	3,48	0,13	43,35	P	12,46	N
A372	Rizosfera	2,49	0,10	30,11	Q	12,09	N
C287	Rizosfera	4,14	0,15	49,84	P	12,04	N
CO27	Solo	3,65	0,13	43,22	P	11,84	N
R3112	Rizosfera	3,80	0,13	43,35	P	11,41	N
A342	Rizosfera	3,20	0,14	36,01	Q	11,25	N
AL24	Solo	4,38	0,15	49,06	P	11,20	N
RU53	Solo	2,80	0,10	29,85	Q	10,66	N
R342	Rizosfera	3,25	0,11	33,75	Q	10,38	N
CE45	Solo	3,23	0,10	33,10	Q	10,25	N
A313	Rizosfera	2,29	0,08	23,36	Q	10,20	N
A324	Rizosfera	2,29	0,08	23,36	Q	10,20	N
S262	Rizosfera	2,29	0,08	23,36	Q	10,20	N
RU38	Solo	2,39	0,08	24,14	Q	10,10	N
R1112	Rizosfera	3,15	0,10	31,28	Q	9,93	N
C353	Rizosfera	3,85	0,12	38,03	Q	9,88	N
S261	Rizosfera	3,84	0,11	35,43	Q	9,23	O
S112	Rizosfera	3,35	0,10	30,37	Q	9,07	O
AL29	Solo	3,12	0,09	28,17	Q	9,03	O
S221	Rizosfera	4,08	0,11	35,69	Q	8,75	O

AL32	Solo	1,00	0,04	8,70	R	8,70	O
C327	Rizosfera	4,58	0,12	39,59	Q	8,64	O
C1123	Rizosfera	4,20	0,11	35,30	Q	8,41	O
CE33	Solo	4,49	0,14	37,51	Q	8,35	O
C352	Rizosfera	3,45	0,09	26,74	Q	7,75	O
AL73	Solo	5,46	0,12	41,14	Q	7,54	O
S322	Rizosfera	4,27	0,10	31,54	Q	7,39	O
S333	Rizosfera	4,33	0,10	31,28	Q	7,22	O
C336	Rizosfera	4,57	0,10	32,19	Q	7,04	O
S3103	Rizosfera	4,28	0,10	30,11	Q	7,04	O
A312	Rizosfera	4,17	0,08	25,31	Q	6,07	O
C318	Rizosfera	4,20	0,08	23,88	Q	5,69	O
AL124	Solo	2,86	0,07	15,13	R	5,29	O
C383	Rizosfera	4,19	0,08	21,94	Q	5,24	O
R112	Rizosfera	5,48	0,09	26,87	Q	4,90	O
S133	Rizosfera	3,60	0,06	17,01	R	4,72	O
S393	Rizosfera	3,09	0,05	12,21	R	3,95	P
R183	Rizosfera	4,98	0,06	17,27	R	3,47	P
A1101	Rizosfera	3,21	0,05	10,39	R	3,24	P
C324	Rizosfera	2,94	0,04	7,27	R	2,47	P
S153	Rizosfera	3,25	0,04	7,14	R	2,20	P
C277	Rizosfera	0,90	0,03	1,76	S	1,58	P
CO24	Solo	4,28	0,04	6,24	R	1,46	P
A362	Rizosfera	4,36	0,04	4,48	S	1,03	P
R243	Rizosfera	3,02	0,03	2,34	S	0,78	P
AL21	Solo	4,01	0,00	0,00	S	0,00	P
AL33	Solo	1,10	0,00	0,00	S	0,00	P
AL83	Solo	2,96	0,00	0,00	S	0,00	P
CO210	Solo	2,63	0,00	0,00	S	0,00	P
RU210	Solo	3,51	0,00	0,00	S	0,00	P
RU23	Solo	5,25	0,00	0,00	S	0,00	P
RU344	Solo	2,77	0,00	0,00	S	0,00	P
RU35	Solo	4,80	0,00	0,00	S	0,00	P
RU42	Solo	3,01	0,00	0,00	S	0,00	P
RU83	Solo	2,89	0,02	0,00	S	0,00	P
CV (%)	-	-	-	10,10		12,49	

Anexo C - Índice e Eficiência de Solubilização de fosfato monocálcico por bactérias obtidas da rizosfera e de solo pós-cultivo de hortaliças. Avaliações foram realizadas aos 3, 6, 9 e doze dias de crescimento. Médias de seis repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IS = índice de solubilização; ES = eficiência de solubilização.

Tratamento	Origem	c	h	is	erro	S	es3	c6	h6	Is6	erro	S	es	c9	h9	is9	erro	S	es	c12	h12	is12	erro	S	es
AL21	Solo	5.30	15.71	2.97	0.06	A	média	5.44	17.29	3.19	0.10	A	alta	5.58	18.16	3.26	0.07	A	alta	5.65	19.35	3.43	0.08	A	alta
C354	Rizosfera	7.00	14.42	2.06	0.07	F	média	7.00	20.00	2.86	0.06	B	média	7.08	22.83	3.22	0.08	A	alta	7.08	24.00	3.39	0.07	A	alta
SA32	Solo	6.23	17.40	2.81	0.09	A	média	6.22	20.24	3.25	0.04	A	alta	6.36	18.59	2.92	0.14	B	média	6.42	21.40	3.34	0.07	A	alta
A362	Rizosfera	7.58	13.33	1.76	0.10	G	baixa	7.83	20.50	2.62	0.12	C	média	7.83	24.00	3.06	0.12	B	alta	7.83	26.17	3.34	0.12	A	alta
C122	Rizosfera	7.08	13.83	1.95	0.06	F	baixa	7.08	18.58	2.62	0.11	C	média	7.08	20.58	2.91	0.03	B	média	7.08	21.83	3.08	0.04	B	alta
R163	Rizosfera	7.00	14.50	2.07	0.03	F	média	7.00	19.33	2.76	0.06	C	média	7.17	20.75	2.90	0.07	B	média	7.17	22.08	3.08	0.03	B	alta
C312	Rizosfera	6.75	13.48	2.00	0.01	F	média	6.79	17.00	2.50	0.05	D	média	6.87	20.74	3.02	0.11	B	alta	7.00	21.81	3.12	0.10	B	alta
R123	Rizosfera	8.63	15.86	1.84	0.06	G	baixa	8.80	21.57	2.45	0.09	D	média	8.89	26.32	2.96	0.06	B	média	9.16	28.58	3.12	0.03	B	alta
R173	Rizosfera	7.33	15.33	2.09	0.10	E	média	7.33	18.00	2.45	0.13	D	média	7.33	19.42	2.65	0.11	C	média	7.33	21.83	2.98	0.14	B	média
SA34	Solo	8.42	16.71	1.99	0.07	F	baixa	8.59	19.31	2.25	0.05	E	média	7.83	25.36	3.38	0.09	A	alta	8.64	25.25	2.93	0.07	C	média
R142	Rizosfera	7.17	12.00	1.67	0.04	H	baixa	7.17	15.83	2.21	0.10	E	média	7.17	17.83	2.49	0.10	D	média	7.17	19.83	2.77	0.13	C	média
R166	Rizosfera	8.33	15.00	1.80	0.29	G	baixa	8.33	18.67	2.24	0.11	E	média	8.33	20.17	2.42	0.14	D	média	8.33	23.17	2.78	0.14	C	média
C393	Rizosfera	6.83	12.42	1.82	0.04	G	baixa	6.92	13.00	1.88	0.06	H	baixa	6.83	16.75	2.45	0.08	D	média	6.83	19.33	2.83	0.12	C	média
A1142	Rizosfera	6.75	15.58	2.31	0.06	D	média	6.75	16.67	2.47	0.07	D	média	6.75	17.33	2.57	0.07	C	média	6.75	17.83	2.64	0.07	D	média
R1102	Rizosfera	7.00	16.17	2.31	0.02	D	média	7.33	17.67	2.41	0.06	D	média	7.08	18.40	2.60	0.06	C	média	7.17	19.17	2.67	0.04	D	média
SA33	Solo	7.60	15.13	1.99	0.01	F	baixa	7.70	17.64	2.30	0.06	E	média	8.37	21.61	2.59	0.15	C	média	8.37	21.97	2.63	0.03	D	média
R322	Rizosfera	8.47	13.53	1.60	0.02	H	baixa	8.65	19.61	2.27	0.04	E	média	8.81	21.72	2.46	0.09	D	média	9.07	24.70	2.72	0.10	D	média
C366	Rizosfera	6.83	12.50	1.83	0.08	G	baixa	7.00	14.50	2.07	0.03	F	média	6.83	16.50	2.41	0.09	D	média	6.83	18.50	2.71	0.07	D	média
SA31	Solo	4.98	12.75	2.56	0.02	C	média	5.08	12.94	2.55	0.02	D	média	5.25	13.52	2.58	0.09	C	média	5.36	13.75	2.54	0.08	E	média
RU354	Solo	5.04	12.06	2.40	0.03	D	média	5.12	12.35	2.42	0.09	D	média	5.30	12.74	2.41	0.09	D	média	5.35	12.93	2.42	0.12	E	média
S342	Rizosfera	7.08	15.00	2.12	0.09	E	média	7.25	16.00	2.21	0.09	E	média	7.25	17.58	2.43	0.05	D	média	7.25	18.58	2.56	0.02	E	média
S113	Rizosfera	7.62	12.51	1.64	0.04	H	baixa	7.90	16.87	2.14	0.07	F	média	8.10	19.56	2.42	0.06	D	média	8.28	21.10	2.55	0.03	E	média
R3132	Rizosfera	7.33	15.00	2.05	0.06	F	média	7.50	17.08	2.28	0.05	E	média	7.50	17.52	2.34	0.05	E	média	7.50	18.50	2.47	0.07	E	média
S263	Rizosfera	9.62	19.30	2.01	0.04	F	média	9.84	21.72	2.21	0.05	E	média	10.08	23.21	2.30	0.06	E	média	10.39	25.91	2.49	0.03	E	média
A312	Rizosfera	8.42	17.65	2.10	0.07	E	média	8.71	18.39	2.11	0.05	F	média	8.88	20.40	2.30	0.05	E	média	9.04	21.61	2.39	0.06	E	média
R152	Rizosfera	7.17	14.33	2.00	0.12	F	média	7.17	15.42	2.15	0.10	F	média	7.17	16.42	2.29	0.10	E	média	7.17	17.67	2.47	0.10	E	média
S393	Rizosfera	10.53	18.65	1.77	0.05	G	baixa	10.65	22.59	2.12	0.09	F	média	11.04	25.11	2.27	0.05	E	média	11.33	27.33	2.41	0.03	E	média

C117	Rizosfera	8.36	11.75	1.41	0.02	I	baixa	8.51	17.01	2.00	0.06	G	média	8.73	19.60	2.24	0.06	E	média	8.98	21.77	2.42	0.06	E	média
C315	Rizosfera	8.54	12.27	1.44	0.05	I	baixa	8.59	17.23	2.01	0.02	G	média	8.76	20.12	2.30	0.02	E	média	9.08	22.13	2.44	0.02	E	média
S166	Rizosfera	9.58	15.50	1.62	0.08	H	baixa	10.92	22.33	2.05	0.04	G	média	11.08	25.67	2.32	0.05	E	média	11.08	27.17	2.45	0.04	E	média
R223	Rizosfera	7.00	12.17	1.74	0.05	G	baixa	7.33	13.50	1.84	0.06	H	baixa	7.25	16.67	2.30	0.07	E	média	7.25	18.17	2.51	0.07	E	média
CO184	Solo	5.19	6.69	1.29	0.03	J	baixa	5.44	9.68	1.79	0.09	I	baixa	5.49	12.84	2.35	0.07	E	média	5.62	13.74	2.45	0.09	E	média
S1132	Rizosfera	8.43	15.10	1.79	0.07	G	baixa	8.66	15.58	1.81	0.08	H	baixa	8.92	16.96	1.90	0.09	G	baixa	9.11	22.74	2.49	0.16	E	média
SA25	Solo	4.70	12.40	2.64	0.06	B	média	5.07	12.58	2.49	0.06	D	média	5.44	12.95	2.39	0.07	D	média	5.68	13.20	2.33	0.08	F	média
RU213	Solo	5.38	12.28	2.30	0.12	D	média	5.42	12.79	2.37	0.09	D	média	5.52	12.91	2.34	0.06	E	média	5.58	13.04	2.34	0.06	F	média
AL25	Solo	7.37	16.32	2.21	0.03	E	média	7.61	17.22	2.26	0.04	E	média	7.79	18.04	2.32	0.06	E	média	7.83	18.43	2.36	0.07	F	média
RU29	Solo	5.06	11.08	2.19	0.04	E	média	5.18	11.45	2.22	0.04	E	média	5.55	12.33	2.23	0.13	E	média	5.60	12.69	2.27	0.12	F	média
C1133	Rizosfera	8.24	11.75	1.43	0.02	I	baixa	8.37	16.99	2.03	0.04	G	média	8.65	19.74	2.28	0.03	E	média	8.90	20.52	2.31	0.05	F	média
RU164	Solo	4.83	10.45	2.18	0.15	E	média	4.89	10.87	2.23	0.15	E	média	5.21	11.19	2.15	0.08	F	média	5.29	12.13	2.29	0.06	F	média
RU22	Solo	4.77	9.39	1.97	0.02	F	baixa	4.98	10.47	2.11	0.03	F	média	5.02	10.61	2.12	0.03	F	média	5.12	10.77	2.11	0.03	F	média
RU36	Solo	5.23	11.43	2.19	0.07	E	média	5.50	11.59	2.11	0.04	F	média	5.76	12.40	2.16	0.03	F	média	5.84	12.64	2.17	0.03	F	média
RU53	Solo	5.24	10.44	1.99	0.03	F	baixa	5.40	11.34	2.11	0.01	F	média	5.48	11.75	2.15	0.01	F	média	5.58	12.18	2.19	0.02	F	média
AL24	Solo	5.44	10.81	1.99	0.08	F	baixa	5.56	11.09	2.00	0.07	G	média	5.50	11.91	2.19	0.11	F	média	5.77	12.33	2.14	0.09	F	média
C257	Rizosfera	8.59	13.78	1.60	0.08	H	baixa	8.96	16.36	1.83	0.04	H	baixa	9.26	19.65	2.12	0.12	F	média	9.59	21.41	2.23	0.08	F	média
R153	Rizosfera	7.42	11.67	1.57	0.05	H	baixa	7.42	13.23	1.78	0.04	I	baixa	7.58	16.00	2.11	0.16	F	média	7.58	17.08	2.25	0.16	F	média
C287	Rizosfera	8.37	13.34	1.59	0.02	H	baixa	8.57	17.21	2.01	0.03	G	média	8.98	17.92	2.00	0.05	G	média	9.09	20.49	2.25	0.03	F	média
C277	Rizosfera	9.55	13.33	1.40	0.04	I	baixa	9.70	17.36	1.79	0.02	I	baixa	9.97	19.22	1.93	0.03	G	baixa	10.09	22.15	2.20	0.03	F	média
RU38	Solo	7.74	10.88	1.41	0.06	I	baixa	7.74	13.72	1.77	0.04	I	baixa	7.85	14.84	1.89	0.08	G	baixa	7.91	17.39	2.20	0.10	F	média
R1132	Rizosfera	7.58	11.33	1.49	0.03	I	baixa	7.77	13.00	1.67	0.05	I	baixa	7.77	15.75	2.03	0.12	G	média	7.77	17.42	2.24	0.18	F	média
S353	Rizosfera	8.24	10.37	1.26	0.03	J	baixa	8.80	13.09	1.49	0.05	J	baixa	8.90	17.87	2.01	0.04	G	média	9.03	19.57	2.17	0.03	F	média
C353	Rizosfera	7.67	11.84	1.54	0.04	I	baixa	8.00	16.81	2.10	0.05	F	média	8.28	17.06	2.06	0.06	F	média	8.39	17.29	2.06	0.06	G	média
RU103	Solo	8.50	14.67	1.73	0.07	G	baixa	8.52	16.44	1.93	0.07	G	baixa	8.86	18.09	2.04	0.11	F	média	8.93	18.38	2.06	0.11	G	média
RU224	Solo	5.12	10.16	1.99	0.05	F	baixa	5.23	10.62	2.03	0.06	G	média	5.50	10.94	1.99	0.03	G	baixa	5.59	11.65	2.09	0.04	G	média
A1141	Rizosfera	8.50	11.67	1.37	0.05	J	baixa	8.58	15.67	1.83	0.03	H	baixa	8.58	16.83	1.96	0.02	G	baixa	8.67	18.08	2.09	0.04	G	média
CE31	Solo	5.54	10.51	1.90	0.03	G	baixa	6.03	11.56	1.92	0.05	H	baixa	6.79	13.39	1.97	0.05	G	baixa	7.27	15.17	2.10	0.06	G	média
CO210	Solo	7.45	13.65	1.83	0.03	G	baixa	7.49	14.25	1.90	0.03	H	baixa	7.53	14.61	1.94	0.05	G	baixa	7.67	15.44	2.01	0.05	G	média
RU42	Solo	7.32	13.49	1.85	0.05	G	baixa	7.43	14.09	1.90	0.04	H	baixa	7.55	14.76	1.96	0.06	G	baixa	7.62	15.41	2.03	0.08	G	média
S1122	Rizosfera	6.67	12.58	1.89	0.05	G	baixa	7.02	12.83	1.83	0.07	H	baixa	7.12	13.58	1.91	0.03	G	baixa	7.17	14.67	2.05	0.05	G	média
C1113	Rizosfera	9.58	13.39	1.40	0.01	I	baixa	9.70	17.34	1.79	0.03	I	baixa	9.78	18.57	1.90	0.05	G	baixa	9.92	20.43	2.06	0.09	G	média
CE45	Solo	4.04	5.68	1.36	0.33	K	baixa	4.62	5.62	1.22	0.38	L	baixa	6.24	11.27	1.81	0.04	G	baixa	6.39	13.28	2.09	0.12	G	média
CO26	Solo	8.15	11.94	1.47	0.03	I	baixa	8.85	17.35	1.96	0.01	G	baixa	9.21	15.74	1.72	0.15	H	baixa	9.52	19.34	2.03	0.04	G	média
CO29	Solo	7.37	14.08	1.77	0.16	G	baixa	7.42	14.67	1.98	0.03	G	baixa	7.58	14.74	1.95	0.03	G	baixa	7.65	15.11	1.98	0.03	H	baixa

RU214	Solo	5.77	10.74	1.86	0.05	G	baixa	5.86	11.55	1.97	0.04	G	baixa	6.04	11.73	1.94	0.04	G	baixa	6.14	12.07	1.97	0.02	H	baixa
RU25	Solo	5.29	10.21	1.94	0.02	G	baixa	5.41	10.88	2.02	0.05	G	média	5.48	10.90	1.99	0.04	G	baixa	5.62	10.99	1.96	0.04	H	baixa
C317	Rizosfera	12.19	17.92	1.47	0.01	I	baixa	14.31	27.18	1.90	0.06	H	baixa	15.64	30.06	1.92	0.06	G	baixa	16.43	31.86	1.94	0.03	H	baixa
R133B	Rizosfera	7.42	11.83	1.60	0.04	H	baixa	7.50	13.75	1.83	0.02	H	baixa	7.50	14.17	1.89	0.02	G	baixa	7.50	14.75	1.97	0.03	H	baixa
RU210	Solo	8.27	14.06	1.70	0.04	H	baixa	8.43	15.62	1.86	0.08	H	baixa	8.63	16.40	1.91	0.09	G	baixa	8.74	16.67	1.91	0.08	H	baixa
RU23	Solo	5.84	11.19	1.92	0.06	G	baixa	6.01	11.45	1.91	0.05	H	baixa	6.11	11.65	1.91	0.05	G	baixa	6.19	11.89	1.92	0.04	H	baixa
C324	Rizosfera	6.83	11.50	1.68	0.05	H	baixa	6.92	12.33	1.78	0.06	I	baixa	7.08	13.00	1.84	0.05	G	baixa	7.08	13.42	1.89	0.04	H	baixa
CO163	Solo	6.55	11.11	1.69	0.03	H	baixa	7.08	12.36	1.73	0.05	I	baixa	7.24	13.49	1.83	0.08	G	baixa	7.33	13.84	1.86	0.07	H	baixa
R192	Rizosfera	8.38	13.20	1.58	0.04	H	baixa	8.73	14.00	1.60	0.06	J	baixa	8.60	15.61	1.81	0.04	G	baixa	8.93	17.51	1.96	0.07	H	baixa
AL29	Solo	6.83	12.31	1.81	0.03	G	baixa	6.95	12.87	1.85	0.04	H	baixa	7.15	12.38	1.74	0.06	H	baixa	7.22	13.33	1.86	0.07	H	baixa
S211	Rizosfera	8.38	14.58	1.74	0.03	G	baixa	8.95	15.73	1.76	0.04	I	baixa	9.63	17.12	1.78	0.08	H	baixa	10.09	19.17	1.90	0.12	H	baixa
R3112	Rizosfera	7.25	10.83	1.49	0.07	I	baixa	7.42	11.83	1.60	0.06	J	baixa	7.62	13.18	1.73	0.03	H	baixa	7.62	14.17	1.86	0.02	H	baixa
R132	Rizosfera	6.92	9.00	1.30	0.02	J	baixa	7.00	9.17	1.31	0.02	K	baixa	7.00	10.50	1.50	0.05	I	baixa	7.00	13.00	1.86	0.04	H	baixa
S324	Rizosfera	7.92	11.85	1.50	0.09	I	baixa	8.27	15.22	1.84	0.08	H	baixa	8.46	15.36	1.81	0.06	G	baixa	8.46	15.36	1.81	0.06	I	baixa
S333	Rizosfera	6.45	10.39	1.61	0.06	H	baixa	6.58	12.14	1.84	0.04	H	baixa	6.73	12.31	1.83	0.04	G	baixa	6.89	12.35	1.79	0.03	I	baixa
C373	Rizosfera	8.28	13.64	1.65	0.08	H	baixa	8.55	15.15	1.77	0.06	I	baixa	8.66	15.95	1.84	0.07	G	baixa	8.75	16.09	1.84	0.07	I	baixa
C112	Rizosfera	14.81	18.50	1.25	0.04	J	baixa	15.06	22.43	1.49	0.09	J	baixa	15.31	28.30	1.85	0.09	G	baixa	15.47	28.53	1.84	0.10	I	baixa
C193	Rizosfera	10.01	15.12	1.51	0.07	I	baixa	10.21	17.83	1.75	0.03	I	baixa	10.35	18.35	1.77	0.03	H	baixa	10.44	18.63	1.78	0.04	I	baixa
C337	Rizosfera	9.01	14.67	1.63	0.05	H	baixa	9.14	15.65	1.71	0.08	I	baixa	9.41	16.39	1.74	0.02	H	baixa	9.47	16.71	1.76	0.02	I	baixa
C142	Rizosfera	8.95	13.62	1.52	0.04	I	baixa	9.13	14.56	1.59	0.04	J	baixa	9.26	15.32	1.65	0.02	H	baixa	9.42	17.08	1.81	0.07	I	baixa
CO28	Solo	5.27	7.39	1.41	0.05	I	baixa	5.45	8.48	1.56	0.11	J	baixa	5.95	10.16	1.71	0.05	H	baixa	6.43	11.75	1.83	0.01	I	baixa
C1103	Rizosfera	7.20	11.65	1.62	0.04	H	baixa	7.34	12.36	1.68	0.02	I	baixa	7.51	12.68	1.69	0.03	H	baixa	7.65	12.97	1.70	0.03	J	baixa
C3113	Rizosfera	9.02	15.19	1.68	0.06	H	baixa	9.54	16.21	1.70	0.05	I	baixa	9.70	16.82	1.73	0.06	H	baixa	9.89	17.30	1.75	0.05	J	baixa
C323	Rizosfera	9.26	15.30	1.65	0.06	H	baixa	9.51	15.92	1.67	0.05	I	baixa	9.77	16.08	1.65	0.06	H	baixa	9.85	16.55	1.68	0.06	J	baixa
A342	Rizosfera	7.08	10.75	1.52	0.05	I	baixa	7.08	11.33	1.60	0.04	J	baixa	7.08	11.42	1.61	0.05	H	baixa	7.08	12.17	1.72	0.05	J	baixa
C152	Rizosfera	9.86	14.89	1.51	0.01	I	baixa	9.97	16.22	1.63	0.03	J	baixa	10.08	16.59	1.65	0.03	H	baixa	10.33	16.89	1.64	0.03	J	baixa
CE44	Solo	9.61	15.06	1.59	0.07	H	baixa	10.51	16.88	1.62	0.03	J	baixa	11.30	18.25	1.62	0.04	H	baixa	11.74	19.99	1.70	0.01	J	baixa
RU211	Solo	4.61	6.75	1.48	0.13	I	baixa	4.79	7.05	1.48	0.07	J	baixa	4.85	8.04	1.66	0.06	H	baixa	4.93	8.19	1.66	0.03	J	baixa
AL84	Solo	7.71	11.18	1.45	0.01	I	baixa	8.61	13.58	1.58	0.02	J	baixa	9.47	14.89	1.57	0.03	I	baixa	10.12	17.44	1.73	0.03	J	baixa
CE32	Solo	5.24	7.50	1.43	0.04	I	baixa	5.53	8.24	1.49	0.04	J	baixa	6.01	9.22	1.54	0.10	I	baixa	6.08	9.92	1.64	0.09	J	baixa
CE33	Solo	5.19	7.60	1.47	0.06	I	baixa	5.44	8.02	1.48	0.02	J	baixa	5.54	8.79	1.59	0.02	I	baixa	5.60	9.54	1.75	0.09	J	baixa
CO24	Solo	8.41	10.72	1.28	0.02	J	baixa	8.63	12.52	1.45	0.04	J	baixa	8.75	13.51	1.55	0.03	I	baixa	8.80	14.83	1.68	0.07	J	baixa
RU34	Solo	6.43	9.93	1.55	0.06	I	baixa	7.38	11.31	1.53	0.03	J	baixa	8.70	12.77	1.47	0.02	I	baixa	9.06	15.08	1.67	0.02	J	baixa
C327	Rizosfera	7.58	9.67	1.27	0.01	J	baixa	7.67	10.33	1.35	0.03	K	baixa	7.67	11.67	1.52	0.04	I	baixa	7.67	12.83	1.67	0.02	J	baixa
C363	Rizosfera	7.17	9.17	1.28	0.01	J	baixa	8.00	10.17	1.27	0.08	K	baixa	8.00	11.97	1.50	0.07	I	baixa	8.00	13.17	1.65	0.07	J	baixa

C1143	Rizosfera	6.90	10.93	1.58	0.06	H	baixa	7.34	11.60	1.58	0.07	J	baixa	7.53	12.03	1.60	0.06	H	baixa	7.69	12.50	1.62	0.06	K	baixa
R146	Rizosfera	8.56	9.68	1.13	0.03	K	baixa	10.14	14.14	1.39	0.03	K	baixa	10.79	17.50	1.62	0.07	H	baixa	11.79	18.40	1.56	0.09	K	baixa
AL73	Solo	10.12	15.35	1.52	0.02	I	baixa	11.25	17.54	1.56	0.04	J	baixa	11.90	18.96	1.59	0.03	I	baixa	12.64	20.00	1.58	0.04	K	baixa
AL83	Solo	8.04	10.89	1.35	0.01	J	baixa	8.69	13.61	1.57	0.03	J	baixa	9.74	14.68	1.51	0.04	I	baixa	10.48	16.00	1.53	0.03	K	baixa
C376	Rizosfera	7.17	11.00	1.53	0.08	I	baixa	7.25	11.50	1.59	0.11	J	baixa	7.25	11.50	1.59	0.11	I	baixa	7.25	11.67	1.61	0.11	K	baixa
CE43	Solo	9.74	14.47	1.49	0.06	I	baixa	11.16	16.23	1.46	0.01	J	baixa	12.34	18.57	1.51	0.05	I	baixa	12.73	20.05	1.58	0.03	K	baixa
S153	Rizosfera	8.02	10.50	1.31	0.11	J	baixa	7.46	11.28	1.51	0.06	J	baixa	7.60	11.75	1.55	0.06	I	baixa	7.73	11.87	1.54	0.06	K	baixa
AL114	Solo	6.42	9.35	1.46	0.04	I	baixa	8.34	11.98	1.44	0.01	K	baixa	10.10	14.81	1.47	0.05	I	baixa	10.85	17.22	1.59	0.01	K	baixa
C183	Rizosfera	9.06	12.71	1.40	0.02	I	baixa	14.75	19.15	1.30	0.08	K	baixa	17.20	26.67	1.55	0.07	I	baixa	17.20	26.67	1.55	0.07	K	baixa
R183	Rizosfera	7.75	9.67	1.25	0.01	J	baixa	7.75	9.67	1.25	0.03	K	baixa	7.75	10.92	1.41	0.02	J	baixa	7.75	11.93	1.54	0.02	K	baixa
SA24	Solo	5.78	7.64	1.32	0.03	J	baixa	6.07	8.13	1.34	0.05	K	baixa	6.42	9.30	1.45	0.02	J	baixa	6.51	9.83	1.51	0.02	K	baixa
S231	Rizosfera	11.79	14.86	1.26	0.04	J	baixa	14.01	15.45	1.10	0.01	L	baixa	15.29	21.32	1.39	0.01	J	baixa	15.93	25.29	1.59	0.05	K	baixa
R133	Rizosfera	8.88	10.00	1.13	0.01	K	baixa	8.93	10.33	1.16	0.02	L	baixa	9.03	10.84	1.20	0.01	K	baixa	9.23	14.76	1.60	0.06	K	baixa
C227	Rizosfera	5.83	9.67	1.66	0.04	H	baixa	6.50	9.67	1.49	0.11	J	baixa	6.50	9.67	1.49	0.11	I	baixa	6.50	9.67	1.49	0.11	L	baixa
CE21	Solo	9.11	12.83	1.41	0.03	I	baixa	11.17	14.94	1.34	0.05	K	baixa	12.61	18.54	1.47	0.05	I	baixa	13.71	19.94	1.45	0.02	L	baixa
S383	Rizosfera	8.19	10.79	1.32	0.02	J	baixa	8.81	12.27	1.39	0.05	K	baixa	9.01	13.38	1.49	0.03	I	baixa	9.17	13.66	1.49	0.03	L	baixa
SA21	Solo	5.63	8.26	1.48	0.11	I	baixa	5.98	8.42	1.41	0.03	K	baixa	6.39	9.52	1.49	0.02	I	baixa	6.67	9.91	1.49	0.01	L	baixa
AL124	Solo	13.21	19.10	1.46	0.03	I	baixa	14.60	21.12	1.47	0.06	J	baixa	15.94	22.33	1.42	0.05	J	baixa	16.49	23.11	1.41	0.04	L	baixa
A324	Rizosfera	7.32	9.65	1.32	0.05	J	baixa	7.43	10.35	1.39	0.06	K	baixa	7.68	10.92	1.42	0.05	J	baixa	7.96	11.09	1.39	0.04	L	baixa
AL164	Solo	11.30	14.88	1.32	0.02	J	baixa	12.68	17.67	1.40	0.03	K	baixa	13.99	19.14	1.37	0.04	J	baixa	14.23	20.42	1.44	0.03	L	baixa
C326	Rizosfera	7.83	10.50	1.34	0.04	J	baixa	7.83	10.50	1.34	0.04	K	baixa	7.92	10.87	1.37	0.03	J	baixa	7.92	10.92	1.38	0.02	L	baixa
C336	Rizosfera	7.67	10.18	1.33	0.07	J	baixa	8.17	11.39	1.39	0.05	K	baixa	8.37	12.10	1.45	0.05	J	baixa	8.58	12.33	1.44	0.04	L	baixa
CO34	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	5.81	7.73	1.34	0.09	K	baixa	5.93	8.02	1.35	0.04	J	baixa	6.13	8.29	1.35	0.03	L	baixa
CO42	Solo	6.26	0.00	0.00	0.00	L	nula	8.58	10.89	1.27	0.03	K	baixa	11.04	15.76	1.43	0.05	J	baixa	11.66	17.04	1.46	0.02	L	baixa
R171	Rizosfera	7.00	9.33	1.33	0.03	J	baixa	7.00	9.33	1.33	0.03	K	baixa	7.00	10.00	1.43	0.03	J	baixa	7.00	10.33	1.48	0.03	L	baixa
C233	Rizosfera	7.33	9.33	1.27	0.01	J	baixa	9.33	11.17	1.20	0.02	L	baixa	9.75	12.00	1.23	0.04	K	baixa	9.75	14.00	1.44	0.03	L	baixa
C1123	Rizosfera	8.42	9.50	1.13	0.02	K	baixa	9.54	12.63	1.32	0.04	K	baixa	9.98	13.52	1.35	0.04	J	baixa	10.57	13.72	1.30	0.03	M	baixa
C162	Rizosfera	6.88	9.08	1.32	0.02	J	baixa	7.20	9.74	1.35	0.04	K	baixa	7.34	9.96	1.36	0.03	J	baixa	7.64	10.15	1.33	0.03	M	baixa
CO41	Solo	8.97	10.96	1.23	0.05	J	baixa	11.05	14.56	1.33	0.04	K	baixa	13.61	17.90	1.33	0.05	J	baixa	14.60	18.21	1.26	0.06	M	baixa
S241	Rizosfera	6.56	7.69	1.17	0.02	K	baixa	6.81	8.61	1.26	0.04	K	baixa	7.11	9.33	1.31	0.05	J	baixa	7.27	9.61	1.32	0.06	M	baixa
C335	Rizosfera	6.70	8.66	1.29	0.02	J	baixa	6.82	8.72	1.28	0.05	K	baixa	6.93	8.97	1.29	0.04	K	baixa	7.03	9.13	1.30	0.01	M	baixa
R3142	Rizosfera	7.87	10.57	1.34	0.03	J	baixa	8.50	10.71	1.26	0.06	K	baixa	8.94	10.98	1.23	0.05	K	baixa	9.27	11.12	1.20	0.04	M	baixa
S322	Rizosfera	7.06	8.47	1.20	0.03	K	baixa	7.33	9.21	1.26	0.03	K	baixa	7.61	9.72	1.28	0.04	K	baixa	7.98	10.10	1.26	0.06	M	baixa
R112	Rizosfera	8.07	8.94	1.11	0.02	K	baixa	8.26	9.21	1.11	0.02	L	baixa	8.40	10.98	1.30	0.05	K	baixa	8.48	11.13	1.31	0.05	M	baixa
R1112	Rizosfera	6.56	8.05	1.23	0.02	J	baixa	7.08	8.16	1.15	0.05	L	baixa	7.18	8.34	1.16	0.05	L	baixa	7.32	8.56	1.17	0.05	M	baixa

A329	Rizosfera	11.42	12.83	1.12	0.02	K	baixa	14.67	15.67	1.07	0.00	L	baixa	17.50	18.42	1.05	0.00	L	baixa	18.08	20.50	1.13	0.16	N	baixa
C237	Rizosfera	11.26	12.79	1.14	0.03	K	baixa	15.36	18.16	1.18	0.03	L	baixa	17.23	18.71	1.09	0.01	L	baixa	19.50	20.83	1.07	0.01	N	baixa
C267	Rizosfera	13.62	14.32	1.05	0.01	K	baixa	16.55	17.50	1.06	0.02	L	baixa	18.30	19.59	1.07	0.02	L	baixa	20.33	21.07	1.04	0.01	N	baixa
C316	Rizosfera	11.25	12.42	1.10	0.01	K	baixa	15.08	16.83	1.12	0.02	L	baixa	18.00	18.75	1.04	0.02	L	baixa	20.50	21.50	1.05	0.00	N	baixa
C352	Rizosfera	13.88	15.69	1.13	0.03	K	baixa	17.52	19.20	1.10	0.02	L	baixa	18.90	20.58	1.09	0.02	L	baixa	21.19	21.78	1.03	0.02	N	baixa
R143	Rizosfera	10.67	11.50	1.08	0.02	K	baixa	14.75	16.00	1.08	0.01	L	baixa	17.50	19.95	1.14	0.10	L	baixa	20.50	21.53	1.05	0.01	N	baixa
S262	Rizosfera	10.67	12.83	1.20	0.01	K	baixa	15.00	17.58	1.17	0.10	L	baixa	18.17	19.75	1.09	0.01	L	baixa	20.50	21.17	1.03	0.01	N	baixa
S313	Rizosfera	11.77	12.34	1.05	0.00	K	baixa	15.39	16.70	1.09	0.01	L	baixa	16.96	18.68	1.10	0.02	L	baixa	19.15	20.02	1.05	0.01	N	baixa
A1101	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A161	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A171	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A242	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A263	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A313	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A314	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A372	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
A383	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
AL27	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
AL32	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
AL33	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C161	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C247	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C318	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C325	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C332	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C346	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C356	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
C383	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO133	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO212	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO23	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO27	Solo	5.78	0.00	0.00	0.00	L	nula	5.81	0.00	0.00	0.00	M	nula	5.86	0.00	0.00	0.00	M	nula	5.96	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO31	Solo	5.74	0.00	0.00	0.00	L	nula	5.74	0.00	0.00	0.00	M	nula	5.94	0.00	0.00	0.00	M	nula	6.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
CO33	Solo	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula
R243	Rizosfera	0.00	0.00	0.00	0.00	L	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	M	nula	0.00	0.00	0.00	0.00	O	nula

Anexo D - Efeito da inoculação de rizobactérias avaliadas nos ensaios II, III e IV, sobre a massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria seca das raízes (MSR) e massa de matéria seca total (MST) de plantas de couve (*Brassica oleraceae*) em casa-de-vegetação. Médias de cinco repetições.

II.

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)*	MSR (g)*	MST (g)*
S112	21,72	2,16	0,62	2,78
C117	20,48	2,07	0,51	2,58
R1112	19,63	2,01	0,55	2,56
C323	19,08	1,94	0,55	2,49
Testemunha	19,04	1,95	0,53	2,48
R123	19,84	1,96	0,52	2,47
A242	18,55	1,91	0,55	2,47
C162	20,10	1,95	0,51	2,46
R3142	19,28	1,91	0,52	2,43
S241	19,02	1,87	0,55	2,42
R132	19,76	1,99	0,43	2,42
C277	19,88	1,85	0,56	2,41
C193	20,29	1,93	0,48	2,41
S1132	20,35	1,97	0,43	2,40
R3132	19,79	1,88	0,52	2,40
C318	20,04	1,91	0,48	2,39
S1122	19,90	1,88	0,50	2,39
S311	20,25	1,86	0,51	2,37
S113	18,49	1,72	0,50	2,22
C324	19,70	1,75	0,43	2,18
S263	18,76	1,73	0,41	2,15
S211	19,29	1,69	0,44	2,13
C354	19,36	1,68	0,37	2,05
CV (%)	8,86	11,04	23,80	11,98

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

III.

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)*	MSR (g)*	MST (g)*
C316	15,84	2,30	0,47	2,77
A263	16,36	2,24	0,47	2,71
S262	15,75	2,27	0,39	2,66
A161	15,12	2,18	0,46	2,63
R192	15,07	2,13	0,47	2,60
R153	15,31	2,15	0,44	2,59
C346	16,24	2,14	0,42	2,56
R142	15,49	2,17	0,38	2,55
S373	15,10	2,08	0,46	2,54
Testemunha	15,51	2,12	0,41	2,53
S1112	14,79	2,15	0,38	2,53
S312	14,60	2,09	0,42	2,52
S353	15,63	2,11	0,40	2,51
C257	15,33	2,06	0,42	2,48
A1142	15,31	2,13	0,34	2,47
R243	14,49	2,03	0,42	2,45
S142	15,25	2,11	0,33	2,44
A171	14,68	2,03	0,38	2,40
S324	14,68	1,99	0,39	2,38
R3112	13,81	1,92	0,32	2,24
CV (%)	8,89	11,84	18,01	10,85

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

IV.

Tratamento	MFPA (g)*	MSPA (g)*	MSR (g)*	MST (g)*
C247	26,47 A	2,49 A	0,47 A	2,96 A
R152	26,08 A	2,68 A	0,54 A	3,22 A
R166	25,88 A	2,45 A	0,58 A	3,03 A
R223	25,82 A	2,28 A	0,42 A	2,70 A
A383	25,77 A	2,43 A	0,38 A	2,81 A
C161	25,42 A	2,30 A	0,41 A	2,71 A
C337	25,24 A	2,42 A	0,51 A	2,93 A
Testemunha	24,46 A	2,17 A	0,46 A	2,63 A
R183	24,18 A	2,59 A	0,40 A	2,99 A
R322	24,03 A	2,39 A	0,39 A	2,78 A
R133B	22,91 A	2,33 A	0,42 A	2,75 A
C152	21,18 A	1,93 A	0,42 A	2,35 A
CV (%)	14,38	22,96	33,39	22,65

* As diferenças entre as médias não foram significativas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.