

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Bactérias Endofíticas como Mitigadoras de Estresse Osmótico em Tomateiro  
( *Solannum lycopersicon* )**

**Karin da Silva Gonçalves**

**2010**



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

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO MITIGADORAS DE ESTRESSE  
OSMÓTICO EM TOMATEIRO ( *Solannum lycopersicon* )**

**KARIN DA SILVA GONÇALVES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Leonardo Oliveira Medici**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências no Curso de  
Pós-Graduação em Fitotecnia.**

Seropédica, RJ  
Outubro de 2010

571.99312

G635b

T

Gonçalves, Karin da Silva, 1978-.

Bactérias endofíticas como mitigadoras de estresse osmótico em tomateiro (*Solanum lycopersicon*) / Karin da Silva Gonçalves - 2010.

42 f.: il.

Orientador: Leonardo Oliveira Medici.

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

Bibliografia: f. 31-42.

1. Bactérias endofítica - Teses. 2. Acinetobacter - Teses. 3. Germinação - Teses. I. Medici, Leonardo Oliveira, 1967-. 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  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**KARIN DA SILVA GONÇALVES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 26 /11 /2010 (Data da defesa)

-----  
Leonardo Oliveira Medici (Dr.) - UFRRJ  
(Orientador)

-----  
João Sebastião de Paula Araujo (Dr.) - UFRRJ

-----  
Fábio Lopes Olivares (Dr.) - UENF

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe Norimar que, lá do céu,  
sei estar zelando por mim, dedico.*

"Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça, para o total. Todos os sucedidos acontecendo, o sentir forte da gente - o que produz os ventos. Só se pode viver perto de outro, e conhecer outra pessoa, sem perigo de ódio, se a gente tem amor. Qualquer amor já é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura."

Guimarães Rosa

## RESUMO

GONÇALVES, Karin da Silva. **Bactérias Endofíticas como Mitigadoras do Estresse Osmótico em Tomateiros**. 2010. 41p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitossanidade (Setor Horticultura) em conjunto com o Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes, ambos do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRuralRJ, município de Seropédica/RJ, período de 2008 a 2010. O objetivo foi testar o efeito de quatro isolados de bactérias endofíticas como mitigadores de estresse osmótico e promotores de crescimento em tomateiros (*Solanum lycopersicon*) da variedade Santa Clara. Sementes de tomateiros foram inoculadas com as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (HRC 54), retirada de raízes de cana, *Burkholderia silvatlanta*, obtida de raízes de abacaxi, *Acinetobacter sp.*, obtida de sementes de tomateiro e mais uma bactéria ainda não identificada, também obtida de sementes de tomateiro. As sementes inoculadas foram empregadas em dois experimentos. No primeiro experimento para avaliar a mitigação do estresse osmótico, plântulas com três dias de idade foram transferidas para caixas plásticas com os potenciais hídricos de 0,0MPa ou -0,53MPa, obtidos com Polietileno Glicol (PEG 6000), nas concentrações de 0,0g L<sup>-1</sup> e 210g L<sup>-1</sup>, respectivamente. No segundo experimento, para avaliar a promoção do crescimento, as sementes foram germinadas em caixas plásticas sem PEG. A variável avaliada no experimento da mitigação foi o crescimento de raiz de plântulas. A promoção do crescimento, por sua vez, foi avaliada com medidas do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e da porcentagem de germinação de plântulas normais. A mitigação do estresse osmótico foi promovida pela inoculação de sementes com *Acinetobacter sp.* Todas as bactérias inoculadas promoveram significativamente o IVG, evidenciando seus potenciais como promotoras do crescimento vegetal.

Palavras chave: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, estresse hídrico, germinação, *Herbaspirillum*, promoção de crescimento.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Karin Silva. **Endophytic Bacteria as Mitigators of Osmotic Stress in Tomato**. 2010. 41p. Dissertation (Masters in Plant Science). Institute of Agronomy, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

This work was accomplished at the Laboratory of Diagnosis of Diseases of the Institute of Agronomy (Campus Horticultura) together with the Laboratory of Epidemiology and Pathology of Seeds of the Department of Fitotecnia of the Institute of Agronomy of UFRuralRJ, in the municipal of Seropédica / RJ, in the period of 2008-2010. The objective was to test the efficiency of four strains of endophytic bacteria to promote growth, vigor and mitigation of water stress in tomato variety Santa Clara. Seeds of tomato were inoculated with *Herbaspirillum seropedicae*, obtained from roots of sugar cane, *Burkholderia silvatlanta*, obtained from roots of pineapple, *Acinetobacter sp.*, obtained from tomato seeds and another bacterium still unidentified also obtained from tomato seeds. The inoculated seeds were used in two experiments. To evaluate the stress mitigation, three-days-old seedlings were transferred to plastic boxes with the hydric potentials of 0.0MPa or -0.53MPa, obtained with Polyethylene Glycol (PEG 6000), at concentrations of 0,0g L<sup>-1</sup> and 210g L<sup>-1</sup>, respectively. To evaluate the growth promotion, the seeds were germinated in plastic boxes without PEG. The trait evaluate in the mitigation experiment was the root length. The growth promotion was evaluated by Germination Speed Index (GSI) and germination rate. The mitigation of osmotic stress effect was promoted by inoculation of seeds with *Acinetobacter sp.* All of the inoculated bacteria increased GSI of the seeds significantly, evidencing their potential as plant growth-promoters.

Key words: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, germination, growth promotion, *Herbaspirillum*, water stress.



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estirpes usadas no tratamento de inoculação.....	17
Tabela 2. Crescimento de raiz de plântulas de tomateiro, sob dois potenciais osmóticos.....	26
Tabela 3. Germinação e IVG de sementes de tomateiro, inoculadas com bactérias.....	29

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Sementes de tomateiros germinadas em caixas gerbox acondicionadas em BOD.....	19
Figura 2 – Colonização bacteriana da rizosfera de plântulas de tomateiro.....	20
Figura 3 – Aspecto das plântulas de tomateiro após três dias de semeadura .....	21
Figura 4- Método de medição de crescimento de raiz. ....	22
Figura 5 – Plântulas de tomateiro consideradas normais para avaliação de IVG.....	23
Figura 6 - Plântulas de tomateiro inoculadas com <i>H. seropedicae</i> .....	25
Figura 7 –Plântulas de tomateiro inoculadas com <i>Acinetobacter sp</i> .....	25
Figura 8 – Número de plântulas de tomateiro normais entre os tratamentos, para o cálculo de IVG.....	29

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Análise de variância para comprimento de raiz de plântulas de tomateiro....24

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Mecanismos de Promoção de Crescimento.....	5
2.1.1 Acido cianídrico (HCN).....	5
2.1.2 Fitormônios.....	6
2.1.3 Mineralização e solubilização de nutrientes.....	8
2.1.4 Fixação de nitrogênio.....	8
2.1.5 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	9
2.1.6 – Produção de oxido nítrico (NO).....	10
2.2 Mecanismos de Mitigação a Estresses Ambientais.....	11
2.2.1 Tolerância à seca.....	11
2.2.2 Tolerância a salinidade.....	12
2.3 Bactérias Endofíticas Patogênicas para Humanos.....	13
2.4 Bactérias Endofíticas.....	14
2.4.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	14
2.4.2 <i>Burkholderia silvatlantica</i> .....	14
2.4.3 <i>Acinetobacter sp.</i> .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
3.1 Tratamentos.....	16
3.2 Origem dos Isolados.....	16
3.2.1 Bactéria “Dominador”.....	16
3.2.2 Demais isolados.....	17
3.3 Material Vegetal.....	17
3.4 Inoculação das Sementes.....	17
3.5 Germinação.....	18
3.6 Viabilidade do Inóculo.....	19
3.7 Experimento I .....	20
3.7.1 Indução do estresse.....	20
3.7.2 Análise de crescimento.....	21

3.8 Experimento II.....	22
3.8.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	22
3.8.2 Porcentagem de germinação de plântulas normais.....	23
3.9 Análise Estatística.....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>

## I - INTRODUÇÃO

A tomaticultura ocupa lugar de destaque na economia brasileira, não somente pelo seu valor econômico, mas também por ser uma atividade geradora de grande número de empregos. O Brasil atualmente é o oitavo produtor mundial e vem apresentando, nos últimos anos, incremento de cerca de 22% na área cultivada. O tomate é uma olerícola com alta demanda de consumo em nível nacional, apenas sendo superado pela batata e sucedido pela cebola. Essa alta demanda se dá provavelmente devido à sua versatilidade na alimentação, consumido tanto “*in natura*”, como cozido ou industrializado. Segundo o último levantamento do IBGE feito em 2008, o Brasil possui 61.025ha de seu território utilizado pela cultura, sendo a região Sudeste responsável pela maior área de produção, com 23.098ha, seguido pela região Nordeste com 13.650ha, depois a região Centro-Oeste com 13.391ha, região Sul com 9.341ha e por último a região Norte com 1.545ha de área cultivada. Dentre os estados produtores, Goiás contribui com a maior produção, chegando ao valor de 1.148.695 Mg ano, sendo seguido por São Paulo com 770.8 Mg ao ano e em terceiro lugar temos Minas Gerais com 463.571 Mg ao ano. O Rio de Janeiro possui 2.714ha de área cultivada, o que corresponde a 1,6% do seu território, onde atinge a produção de 208.185 Mg ao ano (IBGE, 2010).

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) é uma solanácea herbácea, com caule flexível incapaz de sustentar o peso dos frutos e manter sua posição vertical. Embora seja uma planta perene, o cultivo é anual. Seu ciclo anual varia de 4 a 7 meses incluindo o período de 1 a 3 meses de colheita (FIGUEIRA, 2000). A espécie vegetal tem como centro de origem provavelmente a região Andina, parte ocidental da América do Sul e da América Central (CAMARGO *et al.*, 2006).

O aumento da produtividade em hortaliças atualmente está também relacionado ao aumento da demanda de água para fins de irrigação, e a satisfação dessa demanda vem se tornando cada vez mais um problema para o agricultor principalmente devido às alterações climáticas desfavoráveis, redução de sua qualidade para fins agrícolas e seu uso em outras atividades. O cultivo do tomateiro envolve várias práticas culturais e entre elas está a irrigação, presente em 100% dos cultivos comerciais. De acordo com SILVA (2006), a irrigação em uma lavoura de tomate chega a 10% dos custos operacionais de todo o ciclo, onde participa de forma decisiva desde a germinação das

sementes até o enchimento do fruto, indicando que somente em cultivos onde haja controle racional do volume hídrico oferecido à planta, será possível obter produtividade economicamente viável.

A água é o elemento básico da vida, e em grande parte isso se dá por ser um solvente universal. Nos vegetais suas funções estão relacionadas com a composição do citoplasma, participação em reações de quebra de moléculas e crescimento celular, manutenção da turgescência, abertura e fechamento estomático, manutenção da temperatura entre outros. A falta de água compromete diretamente a produtividade das plantas.

No tomateiro, a água contribui com 93 a 95% da sua constituição, sendo o restante representado por compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos (CAMARGO *et al.*, 2006). A água de constituição representa um valor ínfimo da água absorvida pelas plantas, uma vez que cerca de 95% é perdida pela transpiração. O estresse hídrico severo no tomateiro causa redução no crescimento celular, comprometendo o desenvolvimento da área foliar, causa também alterações na coloração e aumento da espessura das mesmas e com a permanência da planta sob essa condição de estresse os sintomas podem evoluir para a necrose e queda foliar precoce, afetando diretamente a produtividade e qualidade dos frutos. Redução no número e tamanho das flores também são sintomas observados no tomateiro sob o estresse hídrico.

Uma alternativa para mitigação do estresse hídrico, recentemente relatada na literatura, é a associação da planta com bactérias (BELIMOV *et al.*, 2008; CASSAN *et al.*, 2008; COHEN *et al.*, 2009; FORCHETT *et al.*, 2010; MAYAK *et al.*, 2004; SANDHYA *et al.*, 2009; SARAVANAKUMAR., *et al.*, 2010).

Desde 1940 foram publicados vários relatos sobre bactérias endofíticas (BEs) nativas em sementes, óvulos, tubérculos, raízes, caules, folhas e frutos. Conceitualmente, pode-se adotar que endófitos são microrganismos que podem ser isolados de material vegetal desinfestado superficialmente, e que não causam danos à planta. Assim, podem estar incluídos, como microrganismos endofíticos, tanto os colonizadores com comportamento neutro, quanto os simbiontes, e ainda aqueles que transitam entre colonizando ora endofiticamente ora como epífitas (AZEVEDO, 1999).

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no estudo da ocorrência, do potencial de colonização e da utilização das BEs para promoção de crescimento e maior

tolerância a estresses ambientais por parte dos vegetais . As BEs tem a vantagem de não estarem sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre no solo da rizosfera e têm maior eficiência uma vez que, ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente no sistema radicular, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas. A associação BEs-planta consiste numa interação íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria poderá promover o crescimento e sanidade da planta. Além destas vantagens citadas, o que mais demonstrou interesse até o momento e é onde se concentrou até hoje o maior número de pesquisas foi a capacidade dos microrganismos endofíticos estimularem o crescimento das plantas por mecanismos diretos como a fixação de nitrogênio ou a produção de fitormônios e efeitos indiretos como protetores biológicos contra fitopatógenos e a solubilização de nutrientes. Sabe-se que leguminosas, gramíneas e várias outras plantas lenhosas estabelecem associação com bactérias capazes de reduzir a molécula do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) para a amônia ( $NH_3$ ). Este grupo de bactérias é conhecido como fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas (BALDANI, 1997; DÖBEREINER, 1966; WEBER & FREIRE, 2003). No controle de fitopatógenos, a ação das BEs pode se dar pela produção de antibióticos, sideróforos, HCN etc.

O presente trabalho pretende verificar o potencial de quatro espécies de BEs como mitigadoras de estresse de seca e seu potencial também na promoção de crescimento em plântulas de tomateiro.

## **2- REVISÃO DE LITERATURA**

A seca é um dos estresses mais importantes para as plantas, as quais podem apresentar diferentes graus de resistência. Uma das formas de classificar as resistências é a divisão entre mecanismos de escape, evitamento e tolerância (TURNER, 1986). No escape as plantas podem, por exemplo, apresentar curto ciclo de vida, restrito à época chuvosa. No evitamento as plantas mantêm o grau de hidratação elevado através de aumento da absorção de água e/ou redução das perdas transpiratórias. Na tolerância as plantas entram em equilíbrio termodinâmico com o ambiente e precisam suportar as conseqüências do abaixamento do potencial hídrico, que geralmente acarreta distúrbios



metabólicos que elevam, por exemplo, a produção de espécies ativas de oxigênio, tais como o oxigênio singlete, o superóxido e o peróxido de hidrogênio, as quais oxidam diversos componentes celulares (MILLER *et al.*, 2008). Quando a produção de espécies ativas de oxigênio supera a capacidade dos sistemas antioxidantes, tem-se o chamado estresse oxidativo. As plantas possuem dois tipos de sistemas antioxidantes, um enzimático e um não enzimático. Dentre as enzimas antioxidantes estão a Catalase, a Superóxido Dismutase e a Glutathione Redutase e entre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e a glutathione reduzida.

As enzimas que participam do metabolismo do nitrogênio também tem um papel importante nos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico. A glutamina sintetase é uma enzima importante para a assimilação de nitrogênio em plantas superiores, sendo envolvida também no processo de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  vindo da fotorrespiração e proteólise, processos que são aumentados pela falta d'água. Além disso, a ativação da glutamina sintetase também pode ser relacionada com o ajuste osmótico, uma vez que a síntese de prolina depende da glutamina. A inibição da expressão da isoforma citossólica da glutamina sintetase (GS1) isolada de *Nicotiana tabacum* levou à redução da síntese de prolina e aumento da sensibilidade ao estresse salino (SWEB *et al.*, 1994).

Existem pesquisas relatando que bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) podem induzir tolerância a estresses abióticos, tais como deficiência hídrica, salinidade e deficiência ou excesso de nutrientes (YANG *et al.*, 2008). YANG *et al.* (2008) propuseram o termo "Tolerância sistêmica induzida" (IST) para alterações física e química induzidas nas plantas pelas BPCV, que resultem em aumento da tolerância a stress abióticos como seca, salinidade etc. A estirpe de BPCV, *Achromobacter piechaudii* ARV8, que produz 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, conferiu IST ao estresse osmótico em pimenta (*Capsicum annuum* L.) e em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicon*) (MAYAK *et al.*, 2004). Sob condições de estresse, o fitormônio endógeno etileno (hormônio da senescência) regula a homeostase vegetal resultando em redução no crescimento da raiz. A degradação do precursor do etileno, ACC, pela ACC-deaminase bacteriana é um dos processos que pode evitar esta redução no crescimento (GLICK *et al.*, 2007). Em alface (*Lactuca sativa* L.), sementes pré-inoculadas com BPCV *Pseudomonas mendocina* e o fungo arbuscular micorrízico (*Glomus intraradices*) aumentaram a atividade da enzima antioxidante catalase em condições de seca severa, sugerindo que eles podem ser usados

como inoculantes para aliviar os danos oxidativos suscitados pela seca (KOHLENER *et al.*, 2008). Sob estresse osmótico, feijão pré-inoculado (*Phaseolus vulgaris* L.) com *Rhizobium tropici* e duas estirpes de *Paenibacillus polymyxa* resultaram em aumento da altura dos vegetais, crescimento de massa seca e número de nódulos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), devendo se salientar que a *Rhizobium* é sensível à seca, resultando em uma diminuição significativa da fixação de N<sub>2</sub> quando existe baixa disponibilidade de água de solo.

Como exemplo de proteção a estresse salino, MAYAK *et al.* (2004) mostraram que o conteúdo de etileno de mudas de tomateiro exposto a altas concentrações de sal foi reduzido em aplicação do *A. piechaudii*, indicando que a ACC deaminase bacteriana foi funcional, incrementando o crescimento de mudas de tomateiro em 66 % quando na presença do elevado conteúdo de sal.

As BPCV podem promover proteção às plantas ao alterar a arquitetura e desenvolvimento das raízes com a produção do fitormônio Ácido Indol Acético (AIA) ou aumentando a absorção de íons minerais através do estímulo das bombas ATPases, embora faltem provas experimentais para isso (MANTELIN & TOURAINE, 2004). No próximo tópico serão apresentadas várias formas pelas quais as BPCV podem atuar beneficemente nas plantas.

## **2.1 Mecanismos de Promoção de Crescimento**

### **2.1.1 Acido cianídrico (HCN)**

O crescimento de plantas promovido por BPCV muitas vezes está associada a ao HCN. Esta promoção de crescimento pode ser considerada direta quando o ácido promove o desenvolvimento dos pelos radiculares (LUZ, 1996) e indireta quando o efeito é sobre organismos causadores de doenças.

Em fumo, a bactéria do gênero *Pseudomonas*, produtora de HCN, foi capaz de suprimir o desenvolvimento do fungo *Thielaviopsis* (DEFAGO *et al.*, 1990).

A ação deste ácido pode ter efeitos antagônicos no que se refere à promoção de crescimento. Estudos feitos por ANTOUN *et al.* (1998), em rabanete sob inoculação de diversos isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* observaram que duas espécies produtoras de HCN promoveram grande crescimento de plantas em estufa, quatro promoveram crescimento moderado e duas reduziram o crescimento. Eles levantaram a

hipótese se que a quantidade de ácido produzido pela bactéria pode causar efeitos diversos, ora estimulação, ora inibição de crescimento.

### 2.1.2 Fitormônios

Bactérias produzindo hormônios vegetais têm sido relatadas por pesquisadores. Bactérias como *Bacillus subtilis* e *Azotobacter chroococum* produzem giberelinas, enquanto *Azotobacter brasiliense* é capaz de promover aumento no número de pêlos absorventes e raízes laterais em milho através da produção de AIA, giberelinas e citocininas (LUZ, 1996).

A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada de plantas de cana-de-açúcar produzindo hormônios de crescimento como AIA e giberelina (BASTIÁN, *et al.*, 1998).

A giberelina participa de uma série de eventos relacionados ao desenvolvimento e germinação de sementes como ativação do crescimento vegetativo do embrião, mobilização das reservas do endosperma e no enfraquecimento da camada de endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim seu crescimento. A giberelina também ativa enzimas que irão hidrolizar as reservas da semente (TAIZ & ZEIGER, 2004), promovem também o alongamento celular, permitindo assim maior desenvolvimento de parte aérea e de radícula.

A produção de AIA por bactérias é considerado um importante mecanismo de promoção de crescimento. O AIA atua principalmente na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares que aumentam a absorção de nutrientes pela planta. Nas fases iniciais das culturas, há relatos de que a inoculação com rizóbios produtores de AIA pode aumentar o vigor de plântulas de arroz (BISWAS *et al.*, 2000). Porém, estudos demonstram que apenas em pequena quantidade esse hormônio produzido pela bactéria é capaz de promover crescimento, uma vez que uma das ações desse hormônio é também inibir o alongamento de raiz. Em seus estudos com alface, SCHLINDW *et al.*, (2008) observaram que bactérias que possuíam baixa produção de AIA eram capazes de promover crescimento, enquanto que bactérias que produziam altas concentrações de AIA promoviam efeitos deletérios. Em plantas de rabanete inoculadas por diferentes estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (ANTOUN *et al.*, 1998) produtoras de AIA, também foi observado efeitos de inibição e promoção de crescimento, o que foi atribuído pelo autor a diferentes concentrações do hormônio produzido pelas bactérias.

Ainda na classe de fitormônios, estudos recentes tem chamado a atenção de pesquisadores para o efeito promotor e regulador de crescimento das poliaminas. Poliaminas são polímeros orgânicos de baixo peso molecular, e sua atividade biológica está relacionada a crescimento, desenvolvimento e atenuação de estresses, demonstrando multiplas funções em processos de regulação fisiológica (CASSAN *et al.*, 2009b, cita KUZNETSOV *et al.*, 2006). CASSAN *et al.* (2009b) avaliaram a produção da poliamina cadaverina pela bactéria *Azospirillum brasilense* em interação endofítica com mudas de arroz e a aplicação exógena da molécula, no intuito de associar essa poliamina a promoção de crescimento e mitigação de estresse osmótico. Eles concluíram que a produção de cadaverina pela bactéria pode estar associada ao aumento do comprimento radicular, uma vez que a molécula está envolvida no processo de divisão celular, porém não puderam afirmar essa suposição em seus experimentos, uma vez que não foi possível isolar os possíveis efeitos de outros hormônios produzidos pela bactéria como, por exemplo, o AIA, para isso seria necessário mutantes da bactéria totalmente deficientes na produção desses fitormônios. Já na mitigação do estresse osmótico, tanto a aplicação de cadaverina exógena como a inoculação de bactéria produtora da molécula promoveram a proteção, porém o autor atenta para o fato de que não se deve considerar a presença da poliamina como único ou principal agente atenuante, e sim como mais um componente de uma complexa interação de fatores.

Sabe-se que algumas bactérias, através da enzima ACC-deaminase produzida por elas, utilizam como fonte de nitrogênio o composto 1-aminociclopropano-carboxilato (ACC). Esse composto é o precursor do etileno, hormônio que em alta concentração impede o crescimento de raízes (JACKSON, 1991). A hidrólise desse precursor do etileno através da enzima produzida pela bactéria em plântulas pode estimular o crescimento vegetal e o comprimento das raízes (GLICK *et al.*, 2007).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de produzir a enzima ACC-deaminase se mostraram capazes de promover crescimento de plantas e proteção a estresses ambientais como seca e salinidade (GLICK, *et al.*, 1998). Em arroz, essa enzima foi encontrada em alta atividade na bactéria da espécie *Burkholderia phytofirmans*, e essas plantas apresentaram maior desenvolvimento de raízes (NOWAK, 1998).

O triptofano é um aminoácido constituinte de proteínas e precursor na formação de diversas moléculas dentre elas o fitormônio AIA, sendo então um importante

coadjuvante na promoção de crescimento de plantas (VAN de BROEK *et al.*, 1999). Ainda de acordo com de BROEK, a produção de altas quantidades de AIA é considerado um importante parâmetro para seleção de cepas de *Azospirillum* como possíveis promotores de crescimento. GARCIA-OLIVARES *et al.*, (2007) isolaram diversas cepas de *Azospirillum brasilense* de áreas de cultivo de milho no México e selecionaram três cepas de acordo com a maior produção de AIA *in vitro*. As cepas que produziram maior quantidade de AIA associada a maior utilização de triptofano, quando inoculadas em plantas de milho, proporcionaram maior produção de biomassa em casa de vegetação.

### 2.1.3 Mineralização e solubilização de nutrientes

Algumas bactérias podem através da mineralização de nutrientes, aumentar a disponibilidade de nutrientes como o fósforo e ferro, promovendo o crescimento das plantas pela absorção desses elementos mais disponíveis (SILVEIRA, 2001).

O fósforo é um nutriente de baixa mobilidade e solubilidade no solo em vez que em geral se encontra complexado em compostos ferrosos, cálcio e na matéria orgânica. Algumas bactérias são capazes de promover a solubilização e disponibilização desse nutriente, aumentando assim o crescimento do vegetal. Segundo CATTELAN (1999), os principais mecanismos envolvidos na solubilização do fosfato são a produção de CO<sub>2</sub> e ácidos orgânicos, resultantes da mineralização do C, exercendo ação direta sobre os fosfatos inorgânicos; redução de compostos de Fe<sup>3+</sup> para compostos Fe<sup>2+</sup>, que é mais solúvel e facilmente assimilável pelas raízes e; produção de H<sub>2</sub>S sob baixas concentrações de O<sub>2</sub>, que em condições redutoras favorece a solubilização de fosfatos de ferro.

A bactéria *Burkholderia cepacia* promove crescimento em feijoeiro e um dos mecanismos associados a essa promoção foi a solubilização de fosfato (PEIX *et al.*, 2001).

### 2.1.4 Fixação de nitrogênio

Algumas bactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente em plantas através da chamada Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), fornecendo parte do nitrogênio requerido para o desenvolvimento da planta. As bactérias diazotróficas são classificadas basicamente em três tipos que são as de vida livre e que

fixam o nitrogênio para seu próprio consumo, as associativas, que não formam nódulos e contribuem para o crescimento de plantas e as noduladoras, que fixam N<sub>2</sub> e mantêm uma íntima relação com a planta. Nesta área alguns trabalhos têm indicado a importância do estudo de bactérias endofíticas como fixadoras de N<sub>2</sub> em plantas não leguminosas, tais como *Acetobacter* e *Herbaspirillum* e diversas estirpes de *Burkholderia*. A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi associada como fixadora de nitrogênio em diversas *Poacea* por BALDANI *et al.* (1986), e em feijão, a espécie *H. lusitanum* foi encontrada nodulando raízes (VALVERDE *et al.*, 2003).

A fixação de N<sub>2</sub> associativa, que ocorre em plantas não leguminosas, tem como a primeira espécie do gênero *Herbaspirillum* associada a milho, arroz e sorgo sendo *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986). *H. rubrisubalbicans* tem sido encontrada em associação com cana-de açúcar (OLIVARES *et al.*, 1996), abacaxi e banana (CRUZ *et al.*, 2001). Também em plantas não leguminosas, a espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada de cana-de açúcar (CAVALCANTE *et al.*, 1988), *Burkholderia unamae* de cana-de açúcar, milho e café (CABALERO-MELLADO *et al.*, 2004) e *B. tropica* foi isolada cana-de açúcar e milho (REIS *et al.*, 2004).

#### 2.1.5 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

São polímeros de carboidratos produzidos por organismos e encontrados no exterior da célula. No caso de microrganismos, uma das principais funções fisiológicas dos EPS talvez seja a de promover a adesão das células, tanto em superfícies sólidas ou com outras células, formando agregados altamente organizados e hidratados (SERRATO, 2008), chamados também de biofilme (COSTERTON *et al.*, 1995). Essa capacidade de formar agregados confere à célula uma série de vantagens, dentre elas adesão a superfícies, proteção contra variações bruscas no macroambiente, aumento da variabilidade antigênica, retenção de íons e nutrientes e resistência à dessecação (SERRATO, 2008). CHENU & ROBERSON, (1996) verificaram em seus experimentos que a alta produção de EPS sob baixo potencial hídrico possibilitou a sobrevivência de bactérias submetidas a esse estresse por aumentar a retenção de água e regular a difusão das fontes de carbono orgânico.

Esses EPS quando excretados por microrganismos podem provocar alterações físico-químicas e estruturais no solo como, por exemplo, a formação de micro e macroagregados (OADES, 1993), e esse favorecimento da agregação das partículas do

solo aumenta, conseqüentemente, tanto a aeração como a retenção de água, proporcionando benefícios diretos para desenvolvimento vegetal.

BURDMAN *et al.*, 2000, em seus estudos detectaram uma relação positiva entre a quantidade relativa de arabinose produzidas por *A. brasilense* e o grau de agregação do solo promovido pela bactéria, entretanto essa correlação só foi positiva em meio de cultura onde era alta a relação carbono/nitrogênio. Outro estudo com estirpes de *A. brasiliense* mostram que a excreção pela bactéria da combinação de frutose-nitrato foi efetiva no grau de floculação do meio (SADASIVAN *et al.*, 1985). Esse trabalho mostra um outro dado interessante que é o fato da célula bacteriana que produzem polímeros extracelular em excesso possuem a capacidade de encistar durante a floculação, e permanecendo por até seis meses viáveis e resistentes à dessecação.

Existem na literatura diversos trabalhos relatando a promoção de crescimento de plantas pela melhora das propriedades do solo e mitigação de estresses como a seca promovido por bactérias capazes de excretar EPS, entretanto, a real interação que ocorre entre os EPS e a raiz da planta parece ser inespecífica, uma vez que a maioria dos EPS produzidos são insolúveis e fibrosos, não havendo aparente interação molecular com receptores da planta (SERRATO, 2008). Apesar dessa afirmação, JOFRE *et al.*, (2004), em seus estudos com *A. brasilense* em milho, constatou que bactérias mutantes deficientes na produção de EPS mostravam menor agressividade de colonização de raiz que as espécies selvagens.

#### 2.1.6 – Produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) que atua como uma molécula elicitadora importante nas vias de respostas de defesa em plantas (DIAS *et al.*, 2007). DIAS *et al.*, (2007), cita que o NO participa de diversos processos fisiológicos, como a promoção da germinação, extensão foliar, crescimento de raízes, senescência, maturação e fixação de nitrogênio nos nódulos das raízes. BASHAN & BASHAN (2010), citam em sua revisão que um dos principais mecanismos de promoção de crescimento atribuído ao NO é a sua participação na via de sinalização do AIA, induzindo a formação de raízes laterais e adventícias. MOLINA-FAVERO *et al.*, (2008) desenvolveram um interessante estudo onde foi usado um mutante de *A. brasilense* AIA-atenuado (FAj 009) e outro mutante nitrato redutase-negativo (Faj 164) para estudar a promoção de crescimento de raízes laterais e raízes adventícias pelo NO

produzido pela bactéria em tomateiro. De acordo com seus resultados, o mutante AIA-atenuado quando crescido em meio contendo nitrato gasoso, produziu maior quantidade de moléculas de NO quando comparado ao mutante nitrato-redutase-negativo, indicando que a denitrificação aeróbica é uma importante fonte de NO. O mutante Faj 009 foi capaz de promover tanto o crescimento de raízes laterais como adventícias, o que não ocorreu com o mutante Faj 164 o que levou a conclusão de que a síntese de NO aeróbico pode ser feita por diversas vias e que a promoção de crescimento de raízes está diretamente ligada a produção de NO, independente da capacidade da bactéria para síntese de AIA.

## **2.2 Mecanismos de Mitigação a Estresses Ambientais**

### **2.2.1 Tolerância à seca**

A falta de água no solo pode estimular a produção de etileno pela planta e inibir o crescimento das raízes. MAYAK *et al* (2004) em seu trabalho com tomate e pimenta demonstrou a correlação entre a produção de etileno pela planta e a promoção de crescimento e mitigação da seca pela bactéria *A. piechaudii* ARV8 produtora da enzima ACC-deaminase. Plantas de tomateiro inoculadas pela bactéria, submetidas ou não a estresse osmótico apresentaram menor concentração de etileno que plantas hidratadas e submetidas a estresse sem associação com a bactéria. Os resultados demonstraram que ao final do experimento, as plantas inoculadas apresentaram maior peso de matéria seca e fresca. Em ervilhas, o umedecimento do solo com solução bacteriana de *Variovorax paradoxus* produtora de ACC-deaminase (BELIMOV *et al.*, 2008) antes do transplântio das mudas, promoveu o crescimento, aumentou a produção e a eficiência do uso da água na cultura e como efeito sistêmico, a bactéria promoveu o aumento da concentração de ABA no xilema sob seca severa. Outro efeito interessante foi o fato de que a bactéria aumentou a nodulação por bactérias simbióticas, que são conhecidas por não tolerarem a falta de água.

SANDHYA *et al*, (2009) em seus experimentos observaram que algumas estirpes de bactérias fluorescentes retiradas de diversos tipos de solo, produziam maior quantidade de EPS quanto maior a tensão hídrica a que eram submetidas, indicando que a produção desse polissacarídeo estava ligado à resposta ao estresse. Ao inocular estas bactérias selecionadas em sementes de girassol, constataram que as mesmas eram capazes de promover o crescimento das plântulas e aliviar os sintomas de estresse



osmótico, o que foi atribuído as propriedades do EPS de absorção de água e estabilização coloidal.

CASSAN *et al.*, (2009b), em seus estudos com arroz sob inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* produtora da poliamina cadaverina e ABA, observou que ao provocar um estresse osmótico na planta, a bactéria tanto promoveu o crescimento de raiz quanto mitigou os sintomas do estresse osmótico, o que foi atribuído pelos autores em parte ao efeito protetório da cadaverina.

### 2.1.2 Tolerância a salinidade

Elevados teores de sais no solo podem afetar o crescimento da planta e consequentemente a produtividade.

EGAMBERDIEVA *et al.* (2008), em seu estudo com plantas de trigo *in vitro* isolaram oito bactérias que promoveram proteção as plantas expostas a salinidades por diferentes mecanismos, dentre eles a produção pelas bactérias do composto volátil HCN, enzimas lípases e proteínases e produção de auxinas. Dentre esses isolados estavam duas estirpes de *Acinetobacter sp.* que demonstraram comportamentos diferentes em relação a promoção de crescimento de parte aérea e raiz de plântulas. Embora as duas produzissem exoproteínas e produzissem alta concentração de auxinas, apenas uma estirpe promoveu o crescimento das plântulas submetidas a salinidade.

Na presença de excesso de sódio no solo, o transportador de íons de alta afinidade  $K^+$ -  $Na^+$  (HKT1) da raiz, que a transporta para o interior da raiz tanto sódio como potássio, opera como um sistema de absorção de sódio em detrimento da absorção de potássio devido a maior presença desse íon. Entretanto, não só as raízes possuem esse transportador como também as folhas e sua ação é regulada diferentemente de acordo com o tipo de tecido em que ele se encontra. ZHANG *et al.*, (2008) em seu trabalho com *Arabidopsis*, demonstraram que a excreção de compostos voláteis orgânicos pela bactéria inoculada resultou em uma menor expressão do transportador e menor absorção de sódio pelas raízes, enquanto estimulou o transportador da parte aérea. Aparentemente a superexpressão desse transportador nas folhas retiraria o sódio do xilema diminuindo sua circulação pela planta.

Em experimentos com *Arabidopsis thaliana* inoculadas com a bactéria *A. brasilense* e submetida a estresse salino, foi detectado o dobro do conteúdo normal de

ABA na planta sob estresse (COHEN *et al.*,2008). Este resultado serve em parte para explicar alguns dos mecanismos de proteção de bactérias a estresses ambientais.

### **2.3 Bactérias Endofíticas Patogênicas para Humanos**

Apesar dos diversos efeitos benéficos, acima relatados, as bactérias endofíticas também podem causar problemas à saúde humana e este risco sempre deve ser considerado.

Bactérias possuem o metabolismo versátil o que é vantajoso para elas uma vez que permite adaptabilidade a diversos ambientes. Porém, essa versatilidade possibilita a associação desses organismos a diversos nichos ecológicos o que as tornam perigosas, devendo a sua introdução em um ambiente ser cuidadosamente e seriamente estudada por profissionais capacitados.

A Fibrose Cística (FC) é uma doença pulmonar de ocorrência em humanos e estes se tornam susceptíveis a diversas infecções durante todo o período de convivência com a doença, infecções que podem resultar em morte. Uma grande parte das infecções causadas nestes pacientes é atribuída a bactéria *P. aeruginosa*. Entretanto, estudos têm associado o agravamento da deteriorização pulmonar também à bactéria *B.cepacia* e vários genovares do complexo *B. cepacia* já foram encontrados em hospitais do Reino Unido, Canadá e Estados Unidos (MOORE *et al.*, 2003). A *B. cepacia* é um organismo do solo presente na rizosfera de plantas, causa doenças em cebola, é considerada BPCP em feijão e trigo e fixa nitrogênio em milho e atua no controle biológico de inúmeros fungos (PERINI, 2007). Os genovares do complexo *B. cepacia*, *B. cenoceacea* e *B. multivorans* também foram encontrados associados causando infecções em doentes (COENYE *et al.*, 2003). Sua capacidade de transferência vertical e horizontal de genes a torna um potencial patógeno humano. Em decorrência a essa capacidade, a agência internacional “Unite States Environmental Protection Agency” postou em seu site que o conhecimento atual da taxonomia e genética de estirpes bacterianas usadas no biocontrole de plantas não permitem afirmar que as mesmas não causariam doenças em pacientes com Fibrose Cística.

As bactérias *B. mallei* e *B. pseudomallei* são bactérias encontradas no solo e em água parada e causam doenças inflamatórias e infecciosas em humanos e animais. Em 2004 foi relatado por MIRALLES *et al.*, como a causadora da morte de um indivíduo no Ceará. MACK & TITBALL em 1998 já haviam detectado em seus estudos, sequencias

de inserções de *B. pseudomallei* em *B. cepacia* atestando assim o potencial risco do uso de bactéria do gênero *Burkholderia* na agricultura.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* também são associadas a infecções hospitalares em doentes com sistema imunológico deficiente em unidades de tratamentos intensivos (SEIFERT *et al.*, 1994), (BERGOGNE-BEREZIN & TOWNER, 1996).

## **2.4 Bactérias Endofíticas**

Neste tópico serão apresentadas características das bactérias usadas no presente trabalho.

### *2.4.1 Herbaspirillum seropedicae*

São bactéria endofíticas diazotróficas, gram-negativas, em forma de bastão, moveis, vibrióides, aeróbicas e capazes de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia (LOPES, 2009; PERIN, 2007) e sua primeira descrição foi feita em 1986 quando foi isolada da rizosfera, rizoplano e raízes de arroz, milho e sorgo (BALDANI *et al.*, 1986).

A associação da bactéria em plantas como a cana-de-açúcar, milho e o sorgo (DOBEREINER, 1995) sem, no entanto, causar patogenicidade tem despertado o interesse de pesquisadores. Das 9 espécies descritas atualmente, apenas *H. seropedicae*, *H. Rubrisubalbicans*, *H. Lusitanun* e *H. frisingense* são capazes de fixar nitrogênio em plantas não leguminosas.

Em experimentos com milho em casa-de-vegetação, ALVES (2007) obteve bons resultados de incremento de biomassa seca de parte aérea, sendo selecionada estirpes para testes em condições de campo na Embrapa Agrobiologia. A produção de AIA nessa espécie foi detectada (BASTIAN *et al.*, 1998).

### *2.4.2 Burkholderia silvatlantica*

As bactérias do gênero *Burkholderia* ocupam diversos nichos ecológicos desde plantas a seres humanos. São diazotróficas e se associam com plantas leguminosas formando nódulos e plantas não leguminosas promovendo o crescimento pela fixação de nitrogênio e produção de fitormônios (PERIN, 2007). O gênero *Burkholderia* foi criado em 1992 por YABUUCHI *et al.*, (1992), que a detectou causando podridão em

casca de cebola e com base no seqüenciamento de rRNA, dados de hibridação DNA-DNA, composição celular de lipídeos e ácidos graxos e características fenotípicas, as separou do gênero *Pseudomonas*. Esse gênero atualmente conta com 37 espécies descritas e se associam com diversas espécies vegetais (PERINI, 2007).

LUVIZOTTO *et al.* estudando a diversidade de *Burkholderia* em raízes de cana-de-açúcar, constatou que dos 39 isolados do gênero encontrados, 87,2% foram positivos para Fixação de Nitrogênio, 100% positivos para produção de AIA; e 100% positivos para solubilização de fosfato inorgânico, demonstrando o grande potencial do gênero como agente biotecnológico.

A espécie *B. silvatlantica* é gran-negativa, aeróbica, suas células possuem a forma de bacilos e com flagelos polares, não possuem cápsulas (PERIN, 2007).

#### 2.4.3 *Acinetobacter* sp.

A bactéria do gênero *Acinetobacter* são bacilos Gran-negativos, que se apresentam como coco-bacilos na fase estacionária de crescimento e em meios não seletivos, imóveis, aeróbios estritos, não formadores de esporos. São comumente encontrados no solo onde são capazes de mineralizar compostos aromáticos e são também importantes fontes de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Algumas linhagens podem sobreviver tanto em alimentos quanto em equipamentos hospitalares.

Existem poucos trabalhos relatando sua associação a plantas. SILVA (2008), avaliando os mecanismos de transmissão *Xanthomonas vesicatoria* observou que ao tentar isolar a referida bactéria de sementes contaminadas de tomateiro, ao redor da semente formavam-se colônias de uma outra bactéria de crescimento rápido e agressivo interferindo negativamente no desenvolvimento e no reisolamento da *X. vesicatoria*. Esta bactéria foi identificada como *Acinetobacter* sp., por meio de sequenciamento da sub-unidade 16S de RNA ribossomal.

Em tomateiro, SILVA *et al.* (2008) em seus estudos verificaram que a inoculação de *A. johnsonii* foi capaz de reduzir a severidade de uma doença chamada pinta bacteriana e promover o crescimento de plantas em casa de vegetação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Tratamentos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitossanidade (Setor Horticultura) em conjunto com o Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRuralRJ, município de Seropédica/RJ, período de 2008 á 2010.

Os cinco tratamentos foram constituídos por quatro isolados bacterianos e um controle. Das estirpes usadas, três foram provenientes do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), e um isolado ainda não identificado, denominado “Dominador”, cedido pela Dra. Débora Alves Gonzaga da Silva, do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes.

Foram executados dois experimentos. No primeiro, onde objetivou-se avaliar a mitigação do estresse osmótico em sementes inoculadas com bactérias endofíticas, plântulas com três dias de semeadura em caixas gerbox foram submetidas ao potencial osmótico de 0,0Mpa e -0,53MPa, onde a variável avaliada foi o crescimento de raiz. Já no segundo experimento, foi avaliado a promoção de crescimento e a porcentagem de germinação de plântulas normais sob inoculação, onde o parâmetro de avaliação utilizado foi o Índice de Velocidade de Germinação, baseado no número de plântulas normais a cada dia, a partir do quinto dia de semeadura em caixas gerbox.

#### **3.2 Origem dos isolados**

##### **3.2.1 Bactéria “Dominador”**

Esta bactéria foi nomeada “Dominador” por ter sido proveniente de isolamentos feitos em sementes de tomateiro do híbrido Dominador, coletados na região de Paty do Alferes-RJ.

Os pesquisadores do laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes realizando testes em sementes do híbrido Dominador observaram que, após executarem a desinfestação superficial e implantar as sementes do híbrido em placas de Pétri contendo meio de cultura NA (Nutriente Ágar), ocorria, após 48h o crescimento de um microrganismo bacteriano que apresentava colônias brancas. Essas colônias foram

repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura NA para posterior caracterização e preservação em tiras de papel. A bactéria foi caracterizada como Gram-negativa, em forma de coco-bacilos e aspecto de colônias leitosa de formato côncavo e arredondado, bordos lisos, cor branca brilhante, semelhantes ao gênero *Acinetobacter sp.* isolado pelo mesmo grupo de pesquisa em sementes de tomateiro Santa Clara (SILVA, 2008). Essa bactéria “Dominador” foi inoculada posteriormente em sementes de tomateiro da variedade Santa Clara, onde promoveu o aumento de raízes laterais. O referido isolado está sendo no momento caracterizado por meio de métodos bioquímicos.

### 3.2.2 Demais isolados

Os demais isolados bacterianos são provenientes de diferentes hospedeiros e foram retiradas de diferentes partes da planta como podemos ver na tabela 1.

Tabela 1 – Estirpes usadas no tratamento de inoculação

Bactérias	Código da coleção	Origem do isolado
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HRC 54	Raiz de cana
<i>Burkholderia silvatlanta</i>	UENF 114111	Raiz de abacaxi
<i>Acinetobacter sp.</i>	G1	Sementes de tomateiro

### 3.3 Material Vegetal

As sementes de tomateiro utilizadas no experimento foram da variedade Santa Clara, doadas pela empresa TOP SEED, tratadas com o fungicida THIRAM (dissulfeto tetrametil-tiuram) e apresentavam 92% de germinação. Após o recebimento, permaneceram armazenadas a uma temperatura média de 10 °C.

### 3.4 Inoculação das Sementes

As bactérias foram reavivadas em meio de cultura DYGS (SILVEIRA, 2008) por período de 24h a 28°C. O método de inoculação utilizado foi o de imersão (CORRÊA *et al.*, 2008). Uma alíquota de suspensão bacteriana na sua fase de crescimento exponencial foi diluída em solução salina (NaCl) a 0,85% e calibradas em Espectrofotômetro para a concentração de  $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup> (85% de transmitância) a 620

nm de comprimento de onda (ARAÚJO *et al.*, 2010). Para o tratamento de inoculação as sementes foram submergidas em 30mL dessa suspensão bacteriana seguindo de repouso de uma hora sob leve agitação. Para o tratamento controle, as sementes foram imersas apenas em solução salina. Após esse período as sementes foram secas superficialmente com papel absorvente e semeadas nas caixas gerbox. Estudos prévios feitos no laboratório de Patologia de Sementes demonstraram que a maior densidade populacional das bactérias *Acinetobacter sp.*, *B. silvatlantica*, *H. seropedicae* e a bactéria “Dominador” se concentra entre o período de duas horas após a sua inoculação em sementes de tomateiro (MELO *et al.*, 2010).

### **3.5 Germinação**

O meio de crescimento foi hidropônico, onde foram utilizadas em cada tratamento 400 sementes distribuídas em 16 caixas gerbox, contendo cada caixa 25 sementes, uma folha de papel germitest e 8mL de água destilada. As caixas gerbox foram acondicionadas em BOD na posição inclinada à 45° (figura 1). As sementes foram dispostas de forma que o eixo embrionário ficasse voltado para a posição inferior da caixa de modo que no momento em que a radícula emergisse, seu crescimento inicial se desse o mais verticalmente possível. A temperatura da BOD foi fixada em 25<sup>0</sup>C, sob fotoperíodo de 12h de luz, de acordo com as recomendações da Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Durante todo o experimento, as caixas gerbox foram movimentadas no interior da BOD uma vez ao dia para que não sofressem efeito de blocos.



Figura 1- Sementes de tomateiro germinadas em caixas gerbox semeadas e acondicionadas no interior da BOD sob inclinação de 45°.

### **3.6 Viabilidade do Inóculo**

No intuito de confirmar a colonização da rizosfera das plântulas pelas respectivas bactérias inoculadas, cinco dias após a inoculação e semeadura, plântulas desenvolvidas foram implantadas em placas de Petri contendo meio de cultura DYGS, onde permaneceram por 48h.

Após o período de crescimento da colônia bacteriana, células foram submetidas a teste de Gram e microscopia ótica e, em seguida, comparadas ao isolado original (fig.2).

As plântulas que não sofreram inoculação também foram submetidas a mesma metodologia, não sendo detectado crescimento bacteriano no meio onde foram implantadas.





Figura 2 – Colonização bacteriana da rizosfera de plântulas de tomateiro

### 3.7 Experimento I

#### 3.7.1 Indução do estresse

A simulação de estresse osmótico foi obtida através do uso da molécula Polietileno Glicol 6000 (PEG<sub>6000</sub>), nas concentrações de 0,0g L<sup>-1</sup> e 210g L<sup>-1</sup>, correspondentes aos potenciais hídricos de 0,0MPa e -0,53MPa, respectivamente. Em estudos preliminares ao presente experimento, testando-se diferentes concentrações de PEG<sub>6000</sub>, foi constatado que o potencial hídrico de -0,53MPa era capaz de diminuir em 50% o comprimento das raízes das plântulas de tomateiro quando comparadas ao controle.

Três dias após a inoculação e semeadura, 60 plântulas de cada tratamento, com raízes bem desenvolvidas e tamanhos aproximados de 1 cm (fig.3), foram selecionadas e transferidas para novas caixas gerbox contendo uma folha de papel germitest e umedecidas com 8mL da respectiva concentração de PEG, num total de 5 caixas para cada potencial hídrico, contendo 6 plântulas cada.

Com um paquímetro digital, as raízes foram medidas individualmente. Após a medição, as caixas foram acondicionadas na posição vertical (45°) em BOD, na temperatura de 25°C, em fotoperíodo de 12h de luz como anteriormente (fig 4).



Figura 3 – Aspecto das plântulas de tomateiro após três dias de semeadura em caixa gerbox

### 3.7.2 Análise de crescimento

Dois dias após a aplicação dos diferentes potenciais hídricos foi feita nova avaliação do crescimento das raízes em centímetros das plântulas.

Para evitar o erro na medição do comprimento das raízes entre a primeira caixa avaliada e a última, em decorrência ao rápido crescimento das raízes das plântulas, primeiramente todas foram desenhadas com caneta na parte exterior das caixas. Então com Paquímetro Digital mediu-se novamente o comprimento das raízes (figura 4). Desse comprimento total foi retirado o valor da primeira medição, obtendo-se assim o valor de crescimento das raízes após a aplicação dos diferentes potenciais.



Figura 4- Método de medição de crescimento de raiz. Todas as raízes primeiro são desenhada e depois medidas uma a uma.

### 3.8 Experimento II –

#### 3.8.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

A partir do quinto dia de semeadura e inoculação nas caixas gerbox, começou-se a avaliar o índice de germinação de sementes (IVG), estágio no qual as plântulas provenientes das sementes germinadas apresentavam todas as suas estruturas essenciais visivelmente desenvolvidas (BRASIL, 2009). Essa avaliação foi feita diariamente, no mesmo horário e as plântulas consideradas normais foram contabilizadas e retiradas do substrato após a contagem (fig 5). Retirou-se e contabilizou-se também, as plântulas e sementes infectadas por microorganismos na intenção de não contaminar o restante do material. A fórmula utilizada para calcular o IVG foi a Fórmula de Maguire (OLIVEIRA *et al.*, 2009), onde quanto maior for o IVG, maior será o vigor das sementes.

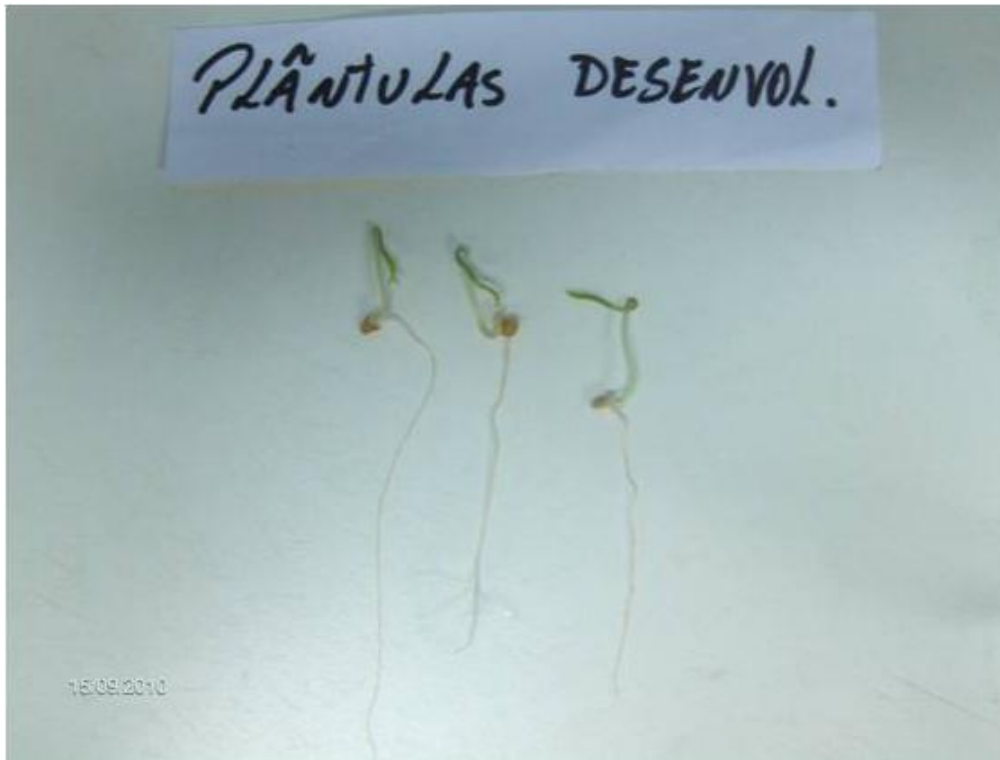


Figura 5 – Plântulas de tomateiro consideradas normais para avaliação de IVG

- Formula de Maguire:

$$IVG = \frac{G_1}{T_1} + \frac{G_2}{T_2} + \frac{G_3}{T_3} + \dots + \frac{G_i}{T_i}$$

Onde:

IVG é o Índice de Velocidade de Germinação;

G1 até Gi é o número de plântulas normais ocorridas em cada dia;

T1 até Ti é o tempo (dias);

O IVG é um valor adimensional e quanto maior o índice, maior será o desenvolvimento inicial das plântulas (tabela 4).

### 3.8.2 Porcentagem de germinação de plântulas normais

Ao final do cálculo do IVG, somou-se o número de plântulas normais totais sob cada tratamento, excluindo-se as plântulas deformadas e infestadas por microorganismos.

### 3.9 Análise Estatística

O delineamento experimental adotado para a avaliação do crescimento de raiz foi o fatorial (5 tratamentos x 2 potenciais hídricos do substrato) com 5 repetições. Os dados de crescimento de raiz foram submetidos à análise de variância. Posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste LSD ao nível de 5% de significância. Foi necessário realizar a transformação de escala dos dados pela fórmula ' $\sqrt{x + 1}$ '.

Para as variáveis IVG e germinação o delineamento foi blocos ao acaso, com os tratamentos constituídos pelas diferentes bactérias e controle. A análise dos resultados destas variáveis também foi feita com análise de variância seguida do teste LSD ao nível de 5% de significância.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento com PEG foi constatado efeito significativo para potencial osmótico ao nível de 0,01% e para a interação tratamento x potencial ao nível de 0,05% para o comprimento de raiz de plântulas de tomateiro (quadro 1).

Quadro 1 - Resumo da análise de variância para os dados de comprimento de raiz, sob diferentes potenciais osmóticos. Seropédica – RJ, 2010.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios
		Comprimento de raiz
Tratamentos	4	0.095094 <sup>ns</sup>
Potencial (Pot)	1	5.182652 <sup>**</sup>
Trat x Pot	4	0.307807 <sup>*</sup>
Erro	261	0.122092
C.V. (%)		20,29

\*, \*\*, NS = significativo a 5% e 0,01%, e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

O desdobramento da interação indica que o efeito do estresse osmótico foi significativo para o controle e para as inoculações com as bactérias Dominador e *B.*

*silvatlanta*. O efeito do estresse osmótico, entretanto, não foi significativo para as sementes inoculadas com *Herbaspirillum* (figura 6) e *Acinetobacter* (tabela 2).

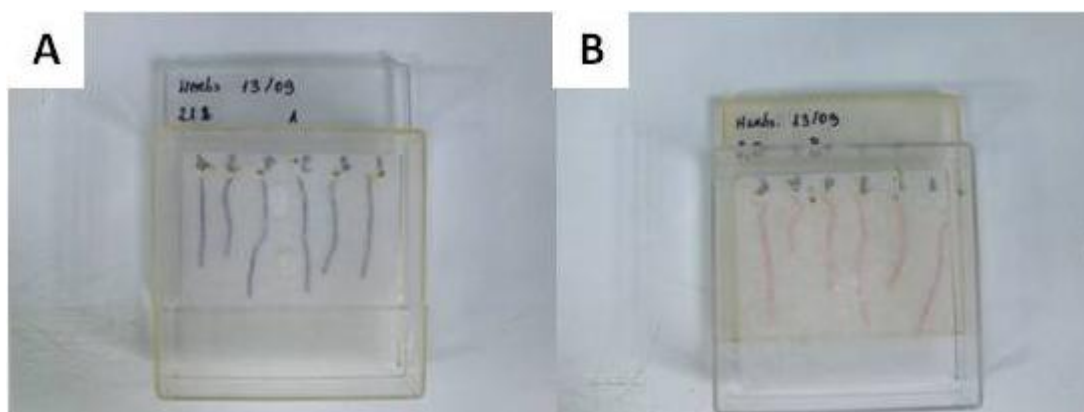


Figura 6 - Plântulas de tomateiro inoculadas com *H. seropedicae*. (A) sob potencial 0,0MPa ;(B) sob potencial -0,53MPa

O desdobramento da interação também indica que as parcelas tratadas com o estresse osmótico de -0,53 MPa diferiram entre si e pode-se observar que as sementes inoculadas com a bactéria *Acinetobacter sp.* apresentaram a maior média de crescimento de raiz de plântulas (tabela 2). Os valores de crescimento sob inoculação com a bactéria *H. seropedicae* não diferiu significativamente dos valores da *Acinetobacter*, mas também não diferiu significativamente dos valores do controle. Estes resultados indicam a mitigação do estresse osmótico principalmente pela bactéria *Acinetobacter*. (figura 7).

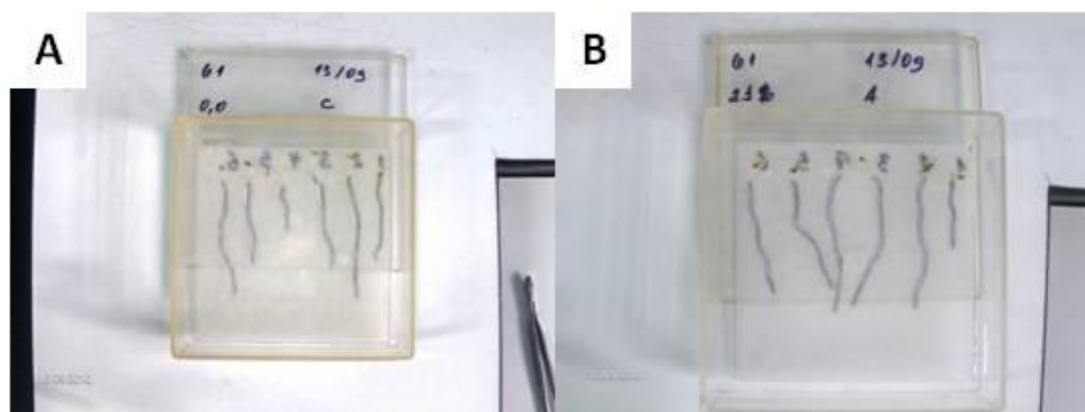


Figura 7 –Plântulas de tomateiro inoculadas com *Acinetobacter sp.*(A) sob potencial osmótico 0,0MPa; (B) sob potencia -0,53MPa.

Tabela 2 - Valores médios em centímetros de crescimento de raiz de plântulas de tomateiro variedade Santa Clara, sob dois potenciais osmóticos e inoculadas com diferentes bactérias. Seropédica – RJ, 2010.

Crescimento de Raiz de Plântulas (cm)					
Tratamento	Controle	<i>Herbaspirillum</i>	Dominador	<i>Burkholderia</i>	<i>Acinetobacter</i>
0,0MPa	2,594	2.434	2.709	2.802	2.507
-0,53MPa	1.416 bc	1.777 ab	1.452 bc	1.338 c	2.094 a
Teste F	*	NS	*	**	NC

\*, \*\* e NS = Significativo a 0,01% e 0,001%, e não significativo, respectivamente, pelo teste F. Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste LSD a 5%.

Em laboratório, a mitigação da seca por bactérias endofíticas em mudas de tomateiro e pimenta também foi constatada por MAYAK *et al.*, (2004) que irrigou as plantas de tomateiro em substrato vermiculita com solução bacteriana, e associou o aumento de biomassa total à capacidade da bactéria em produzir a enzima ACC-deaminase, molécula precursora do Etileno. Em seus estudos, COHEN *et al.*, (2009), associaram o aumento de massa de plantas de milho sob estresse hídrico a produção de ABA e GA pela bactéria endofítica *Azospirillum lipoferum*. FORCHETT *et al.*, (2010) relataram em seu trabalho com sementes de girassol *in vitro* sob inoculação com bactérias endofíticas, aumento de massa seca de raiz e parte aérea sob estresse hídrico, possivelmente pela melhora da absorção de água pelas plântulas. SARAVANAKUMAR *et al.*, (2010), em seus experimentos *in vitro* com a leguminosa *Vigna radiata* obtiveram resultados positivos de crescimento sob estresse, tanto de raiz como parte aérea, e associaram esse crescimento ao aumento da atividade das enzimas anti-oxidantes catalase e peroxidase nas plantas inoculadas

Apesar de existirem trabalhos com resultados positivos de inoculação de bactérias em laboratório, existem outros com resultados contrastantes em casa de vegetação e campo. LIDDYCOAT *et al.*, (2009a) avaliando a mitigação de estresse hídrico de cultivares de aspargos inoculadas com a bactéria *Pseudomonas* spp., encontraram efeito positivo para o crescimento de plântulas tanto em condições ideais de cultivo como quando submetidas a estresse em casa de vegetação. Porém o próprio LIDDYCOAT, em outro experimento também com aspargo submetido a estresse

hídrico, dessa vez sob cultivo em campo, encontra resultado contrário (LIDDYCOAT *et al.*, 2009b), onde a bactéria não promoveu crescimento de plântulas, levantando questões quanto a limitações do uso de bactérias endofíticas em ambientes variados. ANTOUN *et al.* (1998) associam essa variação de resultados entre experimentos em ambientes diversos à complexidade das interações entre a rizosfera e a planta e ao microrganismo introduzido e o resto da microbiota local, neutra ou deletéria. De fato, a sobrevivência e colonização da rizosfera são os principais obstáculos a serem superados por qualquer organismo introduzido em um ambiente, e é por isso que se mostra vantajoso o uso de bactérias endofíticas na inoculação de sementes, pois as mesmas estão livres dessa competição existente na rizosfera. BASHAN & HOLGUIN (1997) em seu trabalho de revisão sobre *Azospirillum* comenta que um dos principais obstáculos do uso da bactéria em grande escala no campo é a imprevisibilidade e inconsistência dos resultados. Eles citam que uma das formas de se obter sucesso no uso de inoculantes bacterianos no campo é atentar para a viabilidade do inóculo e realizar a inoculação das plantas com células em sua fase de crescimento exponencial, e não estacionária, uma vez que é nesta fase que a bactéria sobrevive melhor no solo, mas essa execução parece inviável para o homem do campo.

Sob ausência de estresse osmótico a inoculação com as bactérias endofíticas não promoveu o crescimento de raízes nas plântulas (tabela 2). Esse resultado foi contrário aos encontrados por CONCEIÇÃO *et al.*, (2008) e MARQUES JÚNIOR (2006), que observaram um incremento de 44% e 79%, respectivamente, no comprimento de raiz de milho sob inoculação com bactérias endofíticas. Uma das possíveis explicações para esta falta de concordância entre os resultados é a diferença na forma da inoculação. As diferentes espécies vegetais e bacterianas também podem contribuir para as discrepâncias entre os resultados. CONCEIÇÃO *et al.* recobriram suas sementes com uma película contendo a bactéria antes de semeá-las. Já MARQUES JÚNIOR, não inoculou as sementes e sim expôs as plântulas com solução bacteriana por cinco dias. Também CASSAN *et al.*, (2009a) encontraram resultados positivos de crescimento de raiz de plântulas de milho e soja após a inoculação de sementes com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*, tanto puras como em associação. CASSAN *et al.*, avaliaram o crescimento até o décimo quarto dia e o efeito de promoção foi atribuído pelos autores à produção do fitormônio AIA produzido pelas



bactérias que ao excretar no meio de cultura esse regulador, pôde alterar a fisiologia e morfologia dos tecidos.

Avaliando o resultado de IVG, concluimos que o desenvolvimento inicial das plântulas foi promovido pela inoculação das sementes por todas as quatro bactérias, em maior ou menor grau, quando comparados às plântulas cujas sementes não sofreram inoculação, sendo que o melhores resultados foram obtidos com a inoculação de *A. sp.* e *B. silvatlantica*, seguidos da inoculação com *H. seropedicae* e “Dominador” (tabela 3 e figura 8). SCHLINDWEIN *et al.*, (2008) avaliaram a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de alface, após a inoculação de rizóbios, e também concluíram que bactérias endofíticas são capazes de aumentar o vigor inicial das plântulas. Estes autores constataram também que bactérias que possuíam baixa produção de AIA eram capazes de elevar alguns parâmetros da germinação e vigor de plântulas, enquanto que bactérias que produziam altas concentrações de AIA promoviam efeitos deletérios às plântulas de alface, provocando perdas no vigor das sementes e aumento na formação de plântulas anormais.



Figura 8 – Número de plântulas de tomateiro normais entre os tratamentos no primeiro dia de contagem para o cálculo de IVG.

Tabela 3. Valores em porcentagem de plântulas normais e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de tomateiro variedade Santa Clara. Seropédica – RJ, 2010.

Tratamento	Plântulas normais totais (%)	IVG
Controle	73,66	8,73 e
<i>Burkholderia silvatlantica</i>	74,30	9,88 b
<i>Acinetobacter sp.</i>	74,33	10,61 a
Dominador	71,66	9,00 d
<i>Herbaspirillus seropedicae</i>	72,00	9,58 c

Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste LSD a 5%.

A porcentagem de germinação de plântulas normais, ao contrário do IVG, não foi afetada pelas diferentes inoculações com bactérias (tabela 3). Estes resultados concordam com os de SCHLINDWEIN *et al.*, (2008) em sementes de alface inoculadas por Rizóbios produtores de AIA, onde as sementes inoculadas não diferiram estatisticamente do controle e uma estirpe causou prejuízo. Estes resultados também apresentam semelhança com os tratamentos de peletização e condicionamento osmótico em sementes de cenoura, relatados por NASCIMENTO *et al.* (2009), uma vez que “sementes peletizadas e osmoticamente condicionadas apresentaram germinação semelhante à das sementes não peletizadas, mas com maior velocidade de germinação.

Pesquisas futuras sobre quais mecanismos de promoção de crescimento e proteção contra estresse estão envolvidos nesta interação bactéria-planta aqui estudadas são de suma importância, uma vez que é crescente o interesse por agentes biotecnológicos para uso em uma agricultura sustentável e o conhecimento desses mecanismos podem tornar viáveis a aplicação desses microrganismos e a reprodução da sua ação benéfica no ambiente.

## 5. CONCLUSÃO

A bactéria *Acinetobacter sp.* foi capaz de mitigar os efeitos da seca em plântulas de tomateiro sob estresse osmótico *in vitro*, se mostrando uma promissora ferramenta biotecnológica para a finalidade de se promover o uso racional de águas.

As quatro bactérias inoculadas nas sementes aumentaram o vigor das plântulas na ausência de estresse osmótico, podendo ser consideradas Bactérias Promotoras de Crescimento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2007.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSAED, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.

ARAUJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V.; BALDANI, L.D.; BALDANI, J.I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciencia e Tecnologia**. Lavras, 2010.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revta Brasil Bot**, n. 22, p. 225-229, 1999.

BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J. Bactérias Fitopatogênicas Fixadoras de N<sub>2</sub> em associação com plantas. **Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB**. Seropédica, RJ. 26p, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Inter. J. System. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BASHAN, Y. & HOLGUIN G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canada Journal Microbiol**, v. 43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. How the Plant Growth-Promotin Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. (Advances in Agronomy), Burlington: **Academic Press**, v.108, cap. 2, p. 77-136, 2010.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. P. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant growth regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BELIMOV, A.A.; DODD, I.C.; HONTZEAS, N.; THEOBALD, J.C.; SAFRONOVA, V.I.; DAVIES, W.J. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. **New Phytologist**, V. 181, P. 413-423, 2008.

BERGOGNE-BEREZIN, E. & TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiol** v. 9, p.148-165, 1996.

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras de Análise de Sementes**. Brasília, 398p, 2009.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **Microbiology Letters**, v. 189,p. 259-264, 2000.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALVEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. Nov., in N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophy species. **Int.J. Syst. Evol. Microbiology**, v.54, p. 1165-1172, 2004.

CAMARGO, A.M.P.; CAMARGO, F.P.; ALVES, H.S.; CAMARGO FILHO, W. P. Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate. **Informações Econômicas**, SP, v.36, n.6, jun. 2006.

CASSAN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A. LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p.12 -19, 2009.

CASSAN, F.; PERRIG, D.; SGROVY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* E109 and *Bradyrhizobium japonicum* Az39, inoculated alone or in combination, promote seed germination and early growth of seedlings in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.28-34, 2009a.

CASSAN, F.; MAIAL, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p. 12-19, 2009b.

CATTELAN, A.J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **EMBRAPA-CNPS**, Londrina, 36p.1999.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINE, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHARLO, H.C.O.; THULER, R.T.; DE BERTOLI, S.A.; BRAZ, L.T. Inoculação de sementes de repolho com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP) e efeitos na produção. **Horticultura Brasileira**.  
[www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev.../A158\\_T273\\_Comp.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev.../A158_T273_Comp.pdf)

CHENU, C.; ROBERSON, E.B. Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. **Soil Biol Biochem**, v. 28, 877-884, 1996.

COHEN, A.C.; TRAVAGLIA, C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. Canadian Journal of Canadian Botanique -**Revue de Botanique**. v.87, p.455-462, 2009

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regul**, v. 54, p. 97-103, 2008.

CORRÊA, F.M.; CARMO, M.G.F.; [CARVALHO, A.O.](#) Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 71-75, 2008.

CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; JÚNIOR, B.M.; OLIVARES, F.L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. Nota Científica, **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.43, n.4, p.545-548, 2008.

COSTERTON, J.W.; LAWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.;

LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa spp.*) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DEFAGO, G.; BERLING, I.H.; BURGER, U.; HAAS, D.; KAHR, G.; KEEL, C.; VOISARD, C.; WIRTHNER, P.H.; WUTHRICH, B. Supression of black root rot of tobacco by *Pseudomonas* strain: potential application and mechanisms. In: Hornby, D.; Cook, R.J.; Heins, Y. (Eds.) Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford: **CAB International**, p.93-108, 1990.

DIAS, G.B.; RANGEL, T.B.A. Indução de resistência em plantas: o papel do oxido nítrico. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, Vitória, n. 3, p.1-8, 2007.

DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília : **Embrapa – SPI**, Itaguaí, RJ. Embrapa Agrobiologia, 60p. 1995.

ENGAMBERDIEVAL, D.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; GAFUROVA, L.; KUCHAROVAL, Z.; LUGTENBERG, B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with **the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan**. **Environmental Microbiology**, n.10, v.1, p.1-9, 2008

FIGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: **UFV**, 402 p, 2000.



FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R.; CHANWAY, C.P.. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol* v.40, p.182–188, 2008.

FORCHETT, G.; MASCIARELLI, O.; IZAGUIRRE, M.J.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic Fungi. *Curr Microbiol*, p.123-130, 2010.

GARCIA-OLIVARES, J.G.; MEDINA, V.R.M.; LUNA, I.C.R.; HERRERA, A.M.; PEREZ, N.M. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* em El crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev. Fitotec. Mexico*, v. 30 (3), p. 305-310, 2007.

GLICK, B.R.; PENROSE, D.M., LI, J. Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal Theor. Biol.* ,v. 190, p. 63-68, 1998.

GLICK, B.R.; BILJANA, J.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; McCONKEY, B.B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* v.26, p. 227–242, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Confronto das Safras de 2010 e das Estimativas para 2010 – Brasil

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>

JACKSON, M.B.; Ethylene in root growth and development. In: Matoo, A.K.; Suttle, J.C. (Eds.) The plant hormone ethylene. New York: **Boca Raton**, p.159-181, 1991.

JOFRE, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 231, p. 267-275, 2004.

KOHLER, J.; HERNÁNDEZ, J.A.; CARAVACA, F.; ROLD, A.. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. **Funct. Plant Biol.** v. 35, p. 141–151, 2008.

LIDDYCOAT, S.M.; GREENBERG, B.M.; WOLYN, D.J. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on asparagus seedlings and germinating seeds subjected to water stress under greenhouse conditions. **Canadian Journal Microbiology**, v. 55, n.4, p. 388-394, 2009a.

LIDDYCOAT, S.M.; WOLYN, D.J. Field evaluation of asparagus crowns and germinating seeds inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 1133-1138, 2009.

LOPES, A.A.C. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade de milho nos períodos de safra e safrinha. UPIS – Faculdades Integradas – **Planaltina, Brasília**– Projeto de Pesquisa apresentado como exigência para conclusão do curso de graduação em Agronomia. 2009.

LUZ W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** v.4, p. 1 - 49, 1996.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.S.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Diversidade e prospecção biotecnológica de *Burkholderia spp* associadas às raízes de cana-de-açúcar. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**- Porto de Galinhas – PE, resumo 219, novembro de 2008.

MACK, K. & TITBALL, R.W. The detection of insertion sequences within the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* which have been identified previously in *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v.162, p. 69-74, 1998.

MANTELIN, S. & TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake. **J. Exp. Bot.** v. 55, p. 27–34, 2004.

MARQUES JÚNIOR, R.B. Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas. 88p. Tese (Mestrado) - **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Campos dos Goytacazes, 2006.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, n,166, p. 525–530. 2004.

MELO, J.C.; SILVA, D.A.G.; MEDICI, L.O.; CARMO, M.G.F. Efeito de método de inoculação e tempo de repouso após a inoculação sobre o crescimento de diferentes bactérias endofíticas em sementes de tomate. **Jornada científica**, UFRRJ, 2010.

MILLER, G., SHULAEV, V., MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 481–489, 2008.

MIRALLES, I.S.; MACIEL, M. do C.; ALVES, A.; FERREIRA, M.R. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p.51-54, 2004.

MOLINA-FAVERO, C.; CREUS, C.M.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Aerobic Nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. The **American Phytopathological Society**, v. 21 (7), p. 1001-1009, 2008.

MOORE, J.E.; McLLHATTON, B.; BUCHANAN, J. GILPIN, D.; SHAW, A.; HALL', V.; MURPHY, P.G.; ELBORN J.S. Occurrence of *Burkholderia cepacia* in the hospital environment. **Irish Journal of Medical Science**, v.171, p. 131-133, 2003.

NASCIMENTO, W.M.; SILVA, J.B.C.; SANTOS, P.E.C.; CARMONA, R. Germinação de sementes de cenoura osmoticamente condicionadas e peletizadas com diversos ingredientes. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 12-16, 2009.

NOVAK, J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. In **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 122-130, 1998.

OADES, J.M. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. **Geoderma**, v. 56, p.377-400, 1993.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M., BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, A.C.S.; MARTINS, G.N.; SILVA, R.F.; VIEIRA, H.D. Teste de vigor de sementes baseados no desempenho de plântulas. **Revista Científica Internacional**, ano 2, n. 4, 2009.

PEIX, A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELASQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1927-1935, 2001.

PERIN, L. Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*. UFRRJ, 2007. 88 p. TESE (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2007.

REIS, V.M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.;

BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

SADASIVAN, L.; NEYRA C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharide and cyst formation. **Journal Bacteriol.**, v. 163, n. 2, p. 716-723, 1985.

SANDHYA, V.; ALI, S.K.Z.; MINAKSHI, G.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biol. Fertil. Soils**, v. 46, p. 17–26, 2009.

SARAYANAKUMAR, D.; KAVINO, M.; RAGUCHANDER, T.; SUBBIAN, P.; SAMIVAPPAN, R. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. **Acta Physiol Plant**, DOI 10.1007/s11738-010-0539-1, 2010.

SEIFERT, H.; SCHULZE, A.; BAGINSKI, R.; PULVERER, G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Clinical Microbiol**, v. 32, p. 1816-1819, 1994.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, mai-jun, 2008.

SERRATO, R.V. Caracterização química e extrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. UFPR, 2008. 143p. TESE (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Área de Concentração Bioquímica e Biologia Molecular – **Universidade Federal do Paraná**, 2008.

SILVA, R.A. **Comportamento do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) aos endotores de resistência a seca.** 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Piracicaba.

SILVA, D.A.G. Mecanismos de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* (Dodge) Dye em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). UFRRJ, 2008. 124 p. TESE (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2008a.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciências Agronômicas**, v. 32, n.4, p. 1062-1072, jul/ago, 2008b.

SILVEIRA, E.L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 2008. 83f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Curso de Pós-graduação Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, p. 71-100, 2001.

SWEBY, D.L.; HUCKETT, B.I.; WALT, M.P. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* v. Samsun *in vitro* plantlets. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, n.276, p.995-1008, Jul.1994.

TAIZ, L.; ZAINGER, E. Fisiologia vegetal. **Artmed**, Porto Alegre, 3<sup>o</sup> ed, 2004.

TURNER, N.C. Adaptation to water deficits: A changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 175-190, 1986.

VALVERDE, A. VELÁSQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Inter. J. System. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN de BROEK, A.; LAMBRECHT, M.; EGGETMORT, K.; VANDERLEYDEN, J.L. Auxins up-regulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal Bacteriology**, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

WEBER, O.B.; & FREIRE, F.C.O. Contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da bananeira: perspectivas de utilização na produção integrada: Jaguariba.. Embrapa CNPMA. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**; n. 16, p.29, 2003.

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.

YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; Ryu C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, vol.14 n.1, 2008.

ZHANG, H.; KIM, M.; SUN, Y.; DOWD, S.E.; SHI, H.; PARÉ, P.W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1, **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 21, p. 737-744, 2008.