

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO EM COUVE DA FOLHA (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**

**RIO LARGO, ALAGOAS
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Alagoas - *Campus* de Maceió, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Msc. João Manoel da Silva

**RIO LARGO - AL
2019**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

A663p Araújo, Romário Guimarães Verçosa de

Potencial de bactérias endofíticas para promoção de crescimento em couve da folha (*Brassica oleracea var. acephala*). Rio Largo-AL – 2019.

67 f.; il; 33 cm

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso - TCC em Agronomia) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientador(a): Prof. Msc. João Manoel da Silva

1. Micro-organismos endofíticos. 2. Bactérias promotoras de crescimento. 3. Brassicaceae. I. Título.

CDU: 632.3:635.125

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

**Potencial de bactérias endofíticas para promoção de crescimento em couve da
folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
a banca examinadora do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal de
Alagoas (CECA-UFAL), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.


Data da Defesa: 15 de janeiro de 2019.

Resultado: Aprovado

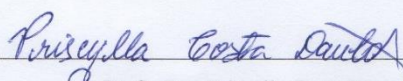


Msc. João Manoel da Silva – RENORBIO/UFAL
Orientador

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Adriana Guimarães Duarte – CECA/UFAL
Examinadora Interna



Profa. Dra. Priscylla Costa Dantas CECA/UFAL
Examinadora Externo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Josemildo Verçosa de Araújo (in memoriam) e Maria das Graças Guimarães de Araújo;

Ao meu irmão, Josemildo Verçosa de Araújo Júnior;

Ao meu sobrinho Gustavo Verçosa de Araújo;

A minha namorada, Larisse Araújo de Abreu.

Por todo carinho, incentivo, credibilidade, compreensão, conselhos e por serem fontes de inspiração que utilizei para seguir em busca de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, supremo Arquiteto do Universo por toda graça alcançada;

Ao meu irmão Josemildo Verçosa de Araújo Júnior, por todo companheirismo, amizade, conselhos e incentivo;

Ao CNPq e FAPEAL pela concessão de bolsas de iniciação científica durante minha graduação;

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização dessa graduação;

Ao corpo docente e técnico do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas;

A Professora Doutora Adriana Guimarães Duarte, por me conceder oportunidade de estágio no Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos, agradeço pelo carinho, paciência, ensinamentos;

A Professora Doutora Tânia Marta Carvalho dos Santos, orientadora paciente e disposta a ajudar, que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia do CECA-UFAL e acreditou no meu potencial;

A minha orientadora de iniciação científica do Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos Priscylla Costa Dantas, pelo apoio, amizade, confiança e orientação;

Ao Engenheiro Agrônomo da Universidade Federal de Alagoas Anderson Rodrigues Sabino, por toda ajuda em trabalhos científicos e acadêmicos, por sua dedicação como profissional e amizade;

Ao João Manoel da Silva, por compartilhar suas ideias, sendo um orientador disposto a trabalhar com seriedade e dedicação;

Ao Antônio Pacífico dos Santos Júnior, companheiro e grande amigo que tive o prazer de estagiar no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;

Aos que fazem parte do Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos, em especial a Professora Adriana Guimarães Duarte, Eng. agrônomo Anderson Rodrigues Sabino e a Pesquisadora Priscylla Costa Dantas, e aos meus queridos amigos Aleska Silva Batista, Gessyca Thays dos Santos Silva e Valdemir Albuquerque da Silva Júnior.

Aos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia, CECA, UFAL, em especial a Professora Tânia Marta Carvalho, a Pesquisadora Yamina Coentro Montaldo, ao Doutorando João Manoel da Silva, e aos amigos Clayton dos Santos Silva e Jessé Rafael Bento de Lima.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram com meu crescimento pessoal. Meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Meu sonho de sociedade ultrapassa os limites do sonhar que aí estão”.

Paulo Freire

RESUMO

ARAÚJO, R. G. V. **POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM COUVE DA FOLHA (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**. 2019, 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

Tendo em vista a preocupação com o meio ambiente e as novas tendências do mercado consumidor, que visa o consumo de alimentos orgânicos ou agroecológicos, vem ocorrendo uma mudança na agricultura dita convencional, que utiliza insumos e fertilizantes químicos, passando a buscar novos métodos de manejo que sejam menos prejudiciais ao ambiente. Objetivou-se por meio desse trabalho, verificar a capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido, de bactérias endofíticas coletadas na mesosfera do semiárido alagoano, a capacidade de alguns desses isolados em colonizar *in vitro* o sistema radicular de plântulas de couve da folha, e verificar a atuação como promotores de crescimento em couve da folha. Ao todo foram isoladas 35 estirpes bacterianas, que foram submetidas a avaliação qualitativa em meio NBRIP sólido, sendo mensurado o diâmetro do halo e da colônia em 3 períodos (5, 10 e 15 dias) e calculado o índice de solubilização (IS), o ensaio foi executado em delineamento inteiramente casualizado em desenho fatorial com 3 repetições. Para avaliação da capacidade de promoção de crescimento, mudas de couve manteiga foram transplantadas para vasos de 500 mL, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6, onde o primeiro fator representa as condições de solo (autoclavado e não autoclavado), e o segundo fator os isolados endofíticos inoculados (ISO31, ISO33, ISO34, ISO48, ISO51 e tratamento controle). Ao septuagésimo sétimo dia após o plantio, foram avaliados os parâmetros biométricos das plantas (altura, diâmetro do coleto, número de folhas, área foliar, biomassa, matéria seca da parte aérea, comprimento do sistema radicular, matéria fresca do sistema radicular e matéria seca do sistema radicular) e foram realizadas análises do teor de clorofila dos tratamentos. Para o teste de colonização *in vitro*, plântulas foram imersas por uma hora em 10 mL de solução bacteriana cultivada por 24 horas com os endófitos, e incubadas em tubos de ensaio em meio ágar-água (0,3%) por sete dias, após incubação, foi avaliado a porcentagem de colonização radicular. Foi verificado a maioria dos isolados bacterianos (74,28%) possuem capacidade de solubilizar fosfato em meio sólido, com destaque para ISO31 e ISO65 que apresentaram os maiores índices de solubilização ao término do ensaio. Os isolados inoculados não apresentaram capacidade de promoção de crescimento para a maioria das variáveis estudadas, sendo verificado incremento significativo apenas para altura das plantas, proporcionado pelo ISO31. A utilização de solo autoclavado, apresentou incremento apenas para biomassa e matéria seca da parte aérea. Em relação ao teor de clorofila, o ISO34 apresentou uma maior média, e a utilização de solo não autoclavado apresentou incremento significativo. No ensaio *in vitro*, foi comprovado a capacidade de colonização radicular, sendo ISO31 e ISO34, os que obtiveram maiores porcentagens de colonização.

Palavras chave: Micro-organismos endofíticos; bactérias promotoras de crescimento; *Brassicaceae*.

ABSTRACT

ARAÚJO, R. G. V. **POTENTIAL OF ENDOFITIC BACTERIA FOR GROWTH PROMOTION IN LEAF COUVE (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**. 2019, 67 p. Monograph (Graduation in Agronomy) - Center of Agrarian Sciences, Federal University of Alagoas, Rio Largo.

Considering the concern with the environment and the new trends in the consumer market, which aims at the consumption of organic or agroecological foods, a change has taken place in the so-called conventional agriculture, which uses chemical inputs and fertilizers, starting to look for new management methods which are less damaging to the environment. The objective of this work was to verify the capacity of solid end phosphate solubilization of endophytic bacteria collected in the mesosphere of the Alagoan semi-arid region, the ability of some of these isolates to colonize *in vitro* the root system of leaf cabbage seedlings, and to verify the performance as promoters of growth in leaf cabbage. A total of 35 bacterial strains were isolated, which were submitted to qualitative evaluation in solid NBRIP medium. The halo and colony diameter were measured in 3 periods (5, 10 and 15 days) and the solubilization index (IS) was calculated. The assay was performed in a completely randomized design in factorial design with 3 replicates. To evaluate growth promotion capacity, cabbage seedlings were transplanted to 500 mL pots using a completely randomized design in a 2 x 6 factorial scheme, where the first factor represents soil conditions (autoclaved and non-autoclaved), and the second factor was the inoculated endophytic isolates (ISO31, ISO33, ISO34, ISO48, ISO51 and control treatment). Seventy - seven days after planting, the biometric parameters of the plants were evaluated (height, collection diameter, number of leaves, leaf area, biomass, shoot dry matter, root system length, fresh matter of the root system and dry matter of the root system) and analyzes of the chlorophyll content of the treatments were carried out. For the *in vitro* colonization test, seedlings were immersed for one hour in 10 mL of bacterial solution cultured for 24 hours with the endophytes, and incubated in test tubes in agar-water medium (0.3%) for seven days after incubation, the percentage of root colonization was evaluated. It was verified that most bacterial isolates (74.28%) have the capacity to solubilize phosphate in solid medium, with emphasis to ISO31 and ISO65 that presented the highest solubilization indexes at the end of the test. The inoculated isolates did not present growth promotion capacity for most of the studied variables, being verified a significant increment only for plant height, provided by ISO31. The use of autoclaved soil presented increment only for biomass and dry matter of the aerial part. In relation to the chlorophyll content, the ISO34 presented a higher average, and the use of non-autoclaved soil presented a significant increase. In the *in vitro* assay, the root colonization capacity was verified, being ISO31 and ISO34, the ones that obtained higher colonization percentages.

Keywords: Endophytic microorganisms; growth promoting bacteria; *Brassicaceae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Xerófita coletada para o isolamento de endófitos bacterianos.....	27
Figura 2. Isolados bacterianos de cactáceas do Semiárido Alagoano.	28
Figura 3. Esquema de distribuição dos tratamentos avaliados em delineamento inteiramente casualizados.....	29
Figura 4. Assepsia das sementes de couve utilizadas para plantio.....	30
Figura 5. Inoculação das bactérias endofíticas em mudas de couve.	31
Figura 6. Avaliação de altura (A) e diâmetro do coleto (B) e área foliar (C) das plantas de couve da folha inoculadas com bactérias endofíticas e cultivadas em duas condições de solo.....	32
Figura 7. Visualização microscópica dos 6 isolados bacterianos endofíticos utilizados para o teste de promoção de crescimento.	33
Figura 8. Determinação do índice de clorofila das amostras de couve..	33
Figura 9. Teste de promoção de crescimento <i>in vitro</i> em plântulas de couve.....	34
Figura 10. Indicação de colonização radicular bacteriana <i>in vitro</i> de plântulas de couve..	35
Figura 11. Solubilização de fosfatos solúveis em meio NBRIP sólidos pelas estirpes bacterianas.	37
Figura 12. Teste <i>in vitro</i> de colonização radicular bacteriana de plântulas de couve.	56
Figura 13. Plântula de couve não microbiolizada (tratamento controle)	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5, 10 e 15 dias de incubação.	38
Tabela 2. Número de folhas de plantas de couve cultivadas com inoculação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.	40
Tabela 3. Médias do número de folhas de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.	41
Tabela 4. Médias de área foliar (cm ²) de plantas de couve cultivadas com aplicação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.	42
Tabela 5. Médias de área foliar (cm ²) de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.	42
Tabela 6. Médias de altura de plantas de couve cultivadas com aplicação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.	43
Tabela 7. Médias de altura de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.	44
Tabela 8. Diâmetro de coleto (mm) de plantas de couve cultivadas com inoculação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.	45
Tabela 9. Diâmetro do coleto (mm) de plantas de couve cultivadas em duas diferentes condições de solo.	46
Tabela 10. Médias da biomassa de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.	46
Tabela 11. Médias da biomassa de plantas de couve cultivadas em duas condições distintas de solo.	47
Tabela 12. Matéria seca de couve inoculada com diferentes isolados de bactérias endofíticas.	48
Tabela 13. Médias da matéria seca da parte aérea de plantas de couve, cultivadas em duas condições distintas de solo.	49
Tabela 14. Comprimento do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.	50
Tabela 15. Médias do comprimento do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.	51
Tabela 16. Médias do peso úmido do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.	51
Tabela 17. Peso úmido do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições distintas de solo.	52
Tabela 18. Médias da matéria seca do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.	52
Tabela 19. Matéria seca do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições distintas de solo.	53
Tabela 20. Teor de clorofila total (µg.g de matéria fresca de folha ⁻¹) em plantas de couve inoculadas com bactérias endofíticas.	54
Tabela 21. Teor de clorofila total (µg. g de matéria fresca de folha ⁻¹) em plantas de couve cultivadas sob duas condições de solo.	54
Tabela 22. Porcentagem de colonização radicular das plântulas de couve inoculadas com os isolados de bactérias endofíticas.	55

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A cultura da couve (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>)	15
2.2 Bactérias endofíticas	19
2.3 Promoção de crescimento por endofíticos	22
2.4 Solubilização de fosfato por bactérias endofíticas	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção das bactérias endofíticas e avaliação da solubilização de fosfato..	27
3.2 Verificação de capacidade de promoção de crescimento em couve	29
3.3 Análise do teor de clorofila total	33
3.4 Teste <i>in vitro</i> para verificação da capacidade de colonização radicular	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Solubilização de fosfato em meio sólido	36
4.2 Promoção de crescimento em couve	39
3.4 Capacidade de colonização radicular <i>in vitro</i>	55
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

A couve da folha (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.) é uma hortaliça anual ou bienal da família Brassicaceae, ganhou destaque devido as novas formas de utilização na culinária e o desejo de manter uma alimentação saudável. De acordo com Djoussé et al. (2004), o consumo de hortaliças e frutas está associado ao menor risco de doenças vasculares e o controle do câncer, o que se atribui ao fato desses alimentos fornecerem quantidades adequadas de fitoquímicos, fibras e outros compostos bioativos (NICOLI; ANESE; PARPINEL, 1999).

A produção brasileira é concentrada na região centro-sul do país, onde é estimado uma área de aproximadamente 6.128 hectares cultivados com couve da folha (VILELA; LUENGO, 2017), no ano de 2006, foram produzidas cerca de 93.551 toneladas de couve no Brasil, com destaque para região Nordeste que foi a segunda região de maior produção no país, responsável por 21,05% da produção anual, ficando atrás somente da região Sudeste (59,86% da produção anual) (SEBRAE, 2006). Dentre os fatores que prejudicam a produtividade dessa cultura encontra-se as condições edáficas, principalmente relacionadas a fertilidade.

Dentre os nutrientes essenciais para estabelecimento de uma cultura, o fósforo apresenta importância no metabolismo vegetal, por atuar na fotossíntese, respiração, armazenamento, transferência de energia, transferência de genes e reprodução (STAUFFER; SULEWSKI, 2004).

Os solos de regiões tropicais e subtropicais apresentam baixa disponibilidade nesse elemento, sendo necessário a utilização de fertilizantes solúveis. Segundo Walpola e Yoon (2012), a utilização desses insumos, além de apresentar um alto custo, tem como problema principal que boa parte do fósforo reage com componentes do solo, formando compostos pouco disponíveis para absorção radicular. Sendo dessa forma necessário o estudo e utilização de outras práticas que visem melhorar a absorção desse elemento.

Os micro-organismos classificados como endofíticos, habitam o interior de plantas, geralmente suas partes aéreas, sem causar danos ao hospedeiro (HALLMANN et al., 1997), característica que os diferem dos micro-organismos patogênicos (AZEVEDO, 1998). No decorrer da evolução, as plantas terrestres, desenvolveram mecanismos de adaptação ao seu habitat que permitiram sua sobrevivência (PEIXOTO NETO;

AZEVEDO; CAETANO, 2004), os micro-organismos associados a essas plantas também passaram por adaptações que conferiam tolerância para sobrevivência em ambientes com adversidades (KAVAMURA et al., 2013).

Dentre as variadas espécies de micro-organismos, destaca-se a ação dos solubilizadores de fosfato, que possibilitam a melhoria na eficiência das fontes de fósforo. A utilização desses micro-organismos, de acordo com Igual et al. (2001), tem sido sugerida como alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante ao melhor aproveitamento dos fosfatos naturais. Sendo assim, a utilização de bactérias endofíticas com capacidade para solubilizar fosfato, depende apenas do conhecimento da sua capacidade de solubilização.

As bactérias endofíticas possuem potencial de interesse para a biotecnologia, por apresentar característica que promove crescimento em plantas em diversas culturas por alguns mecanismos, como: fixação de nitrogênio atmosférico (ANTOUN et al., 1998), solubilização de fosfato (SILVA et al., 2018), produção de fitohormônios, como auxina (BIANCO et al., 2006), etileno (GLICK et al., 2005), citocininas e reguladores de crescimento (SILVA et al., 2018), controle biológico pela competição por nutrientes com patógenos, produção de sideróforos e antibióticos (KLOEPPER et al., 1980).

Dessa forma, objetivou-se por meio desse trabalho avaliar isolados bacterianos coletados em região do semiárido alagoano quanto a sua capacidade de solubilização de fosfato, bem como o potencial para promoção de crescimento em couve da folha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

As plantas da família Brassicaceae (Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida) pertencem à família botânica que abrange o maior número de culturas oleráceas, que se distribuem em hortaliças herbáceas e tuberosas, sendo compostas por distintas variedades botânicas, sendo as de maior importância: couve flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), couve brócolos (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), couve de folha (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.), couve tronchuda (*Brassica oleracea* var. *tronchuda* Bailey), couve de bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker), couve rábano (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) (FILGUEIRA, 2013).

A couve manteiga, também conhecida como couve de folha (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), tem seu centro de origem na região do Mediterrâneo, da Ásia Menor e da Costa Ocidental Europeia, tendo como ancestral a couve silvestre. No Brasil sua introdução deu início na época da colonização pelos portugueses (MADEIRA; REIFSCHNEIDER; GIORDANO et al., 2008).

A couve é uma hortaliça anual ou bienal desse grupo de plantas, que é conhecido popularmente como crucíferas. Devido aos novos hábitos alimentares e às novas maneiras de utilização na culinária, seu consumo vem aumentando de forma gradativa. Outro fator que contribui para o aumento no consumo dessa hortaliça foram as descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutricionais e medicinais. Em relação a outras hortaliças folhosas, a couve destaca-se pelo maior conteúdo de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, fósforo, enxofre, iodo, vitamina A, niacina e vitamina C, vitamina K, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico e carotenoides (FILGUEIRA, 1982; TRANI et al., 2015).

A cultura é adequada na agricultura familiar brasileira devido a sua facilidade de propagação, a couve de folha pode ser propagada por via sexuada através de sementes, ou por via assexuada através de mudas. No Brasil, o método mais utilizado pelos agricultores é a propagação vegetativa, com a formação de mudas a partir dos brotos que surgem nas axilas foliares, na maioria das cultivares comercializadas. As couves híbridas

não produzem brotos, sendo a propagação feita por meio de sementes (TRANI et al., 2015).

A preferência quanto ao mercado consumidor são por cultivares de folhas lisas e clones antigos, propagados vegetativamente. Esses clones tradicionais em Minas Gerais, São Paulo e Goiás são chamados, indistintamente, de tipo “Manteiga”. Existem dezenas desses clones com ampla variação genética. As empresas produtoras de sementes têm introduzido no mercado cultivares melhoradas, inclusive alguns híbridos. Porém, essas cultivares não apresentam características exigidas pelo mercado consumidor. Contudo, alguns desses híbridos produzem folhas grandes, onduladas e macias, com boa produtividade (FILGUEIRA, 2013). O que favorece a atratividade para o mercado consumidor

De acordo com Trani et al. (2015) na propagação vegetativa recomenda-se colocar os brotos para enraizar após serem retirados dos excessos de folhas das plantas adultas, pode-se utilizar para o enraizamento sacos plásticos ou de jornal, com 5 a 6 cm de diâmetro e 10 a 15 cm de altura, ou utilizar bandejas de plástico com 128 células, preenchidas com substrato ou solo rico em matéria orgânica. Na propagação vegetativa é recomendado a utilização de bandejas de plástico de 128 células, com substrato comercial de pinus ou fibra de coco.

A cultura da couve de folha é considerada rústica, quando comparadas as outras crucíferas, inclusive quanto as exigências nutricionais. São mais favoráveis para o cultivo dessa espécie solos argilosos, com pH variando de 5,5 a 6,5. A adubação orgânica é bastante benéfica para essa cultura, principalmente se for realizada antes do transplante, incorporada ao sulco. Em solos pobres é recomendado a aplicação de boro, na forma de bórax. Em solos de fertilidade baixa ou mediana, recomenda-se realizar aplicação de macronutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio no sulco durante o transplante das mudas (FILGUEIRA, 2013).

A couve de folha em geral não costuma apresentar anomalias fisiológicas, portanto, pode-se constatar sintomas de carência do micronutriente molibdênio na forma de grandes orifícios no limbo foliar, bastante semelhante ao dano provocado por lagartas. É recomendado nesse caso a aplicação do micronutriente na forma de molibdato de sódio (FILGUEIRA, 2013).

O espaçamento recomendado em plantios comerciais de couve é de 80 a 100 cm nas entrelinhas por 50 a 70 cm entre plantas, a grande maioria dos agricultores brasileiros adotam o cultivo em linhas simples, porém em algumas regiões do Brasil pode-se encontrar o cultivo em fileiras duplas, com espaçamento de 80 a 100 cm nas entrelinhas duplas e 40 a 50 cm nas entrelinhas simples. Geralmente o espaçamento entre plantas, é de 50 cm, porém esse espaçamento pode variar de acordo com o tipo de solo, declividade do terreno, porte do cultivar de couve e o manejo da cultura (TRANI et al., 2015).

No cultivo da couve é necessária atenção em relação às condições climáticas e necessidade hídrica da cultura, pois o déficit hídrico provoca murchamento das plantas e, juntamente com a insolação podem ocasionar queimaduras nas folhas e brotos, causando a morte da planta. Em relação a irrigação deve-se levar em consideração o período de cultivo no ano, ciclo da cultura, tipo de solo, declividade do terreno, capacidade de drenagem, retenção diária de água e insolação diária.

Os sistemas de irrigação que podem ser utilizados no cultivo da couve são: sulcos, aspersão, gotejamento e microaspersão (TRANI et al., 2015). De acordo com Filgueira (2013), a couve da folha se apresenta como altamente exigente em água, devendo-se realizar irrigações constantes, sendo o sistema por aspersão o mais recomendado para a cultura, pois melhoram a qualidade da folha, além de controlar pulgões e lagartas. O nível de água útil no solo deve ser mantido próximo a 100% da capacidade de campo.

Alguns agricultores realizam a cobertura palhosa do solo, com casca de arroz, hastes de cereais ou capim seco, visando reduzir a temperatura do solo, controlar plantas daninhas e reter umidade. Durante o longo período da colheita, visando estimular a formação de novas folhas na haste principal, é recomendável realizar a desbrota e eliminar as folhas velhas (FILGUEIRA, 2013).

Segundo Trani et al. (2015), a utilização de *mulching* plástico é uma excelente medida para controle de plantas daninhas, além de melhorar a retenção de água no solo. Porém, caso o agricultor não tenha a possibilidade de realizar o investimento, recomenda-se o controle de plantas daninhas por meio de capina superficial, de modo a simplesmente roças as ervas daninhas, tendo cuidado para não ocasionar danos nas raízes.

A produção brasileira é concentrada na região centro-sul do país, onde é estimado uma área de aproximadamente 6.128 hectares cultivados com couve manteiga (VILELA; LUENGO, 2017), os maiores polos de produção do país são: São Paulo, Rio de Janeiro e

Minas Gerais (WRUCK; OLIVEIRA; DIAS, 2010). No ano de 2006, o Brasil chegou a produzir cerca de 93.551 t de couve, com destaque para região Nordeste que foi a segunda região de maior produção no país, com cerca de 19.700 toneladas produzidas, atrás somente da região Sudeste, que foi responsável pela produção nacional de 56.000 t. Os estados de Alagoas (11.885 t), Bahia (3.948 t) e Pernambuco (1.547 t) foram as unidades federativas com maior representatividade na produção familiar de couve comum no Nordeste (SEBRAE, 2006).

O período de colheita de couve da folha pode ser iniciado de 50 a 60 dias após o transplante, porém, é recomendado a colher as primeiras folhas produzidas, após um retardamento proposital na primeira colheita dessa cultura. Pois favorece um melhor desenvolvimento tanto da parte área quanto do sistema radicular, aumentando a longevidade e possibilitando escalonar a colheita ao longo dos meses. Para esse retardamento proposital é recomendado iniciar a colheita aos 80 a 90 dias, e a cultura irá produzir os próximos dois anos. No caso de cultivares híbridas é recomendado iniciar a colheita aos 70 a 80 dias após a sementeira (FILGUEIRA, 2013).

O melhor método de colheita é puxar para baixo as folhas bem desenvolvidas, quebrando-as no ponto de inserção com o caule, sem deixar parte do pecíolo junto à haste. Os mercados consumidores mais exigentes preferem folhas com tamanho de 25 a 30 cm de comprimento, grandes e viçosas, de coloração clara, no caso do mercado mineiro, ou de coloração escura, para os consumidores paulistas. (FILGUEIRA, 2013).

A comercialização dessa cultura é realizada na forma de maços de aproximadamente 400 gramas ou no sistema de semi processamento, onde as folhas são picadas, higienizadas e acondicionadas em bandejas, agregando valor ao produto e satisfazendo um mercado consumidor mais exigente. O consumo se dá in natura na forma de saladas e refogados. Na culinária a couve é utilizada em restaurantes em alguns pratos e bebidas como: suco de couve, carne moída com talos de couve, farofa de couve, caldo verde e sopa de fubá com couve (TRANI et al., 2015).

Para sua comercialização várias características sensoriais e físicas são analisadas pelo mercado consumidor, visando assegurar a receptividade do alimento, como aparência, tamanho, forma, brilho e cor da folha (NOVO et al., 2010). Porém, algumas pragas e doenças podem acarretar perdas da qualidade do produto final, provocando prejuízos econômicos para o agricultor e enfraquecendo a cadeia dessa cultura, pelo fato

de prejudicar a qualidade e diminuir a quantidade do produto ofertado nos supermercados, mercados e feiras livres.

Entre as principais pragas que provocam danos na couve da folha e outras crucíferas, destacam-se os pulgões *Brevicoryne brassicae* (L., 1758) e *Myzus persicae* (SULZER, 1776); a Mosca Branca *Bemisia tabaci* (GENN., 1889); Curuquerê da Couve *Ascia monuste orseis* (LATR., 1819); Traça das Crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1875); Lagarta Rosca *Agrotis ipsilon* (HUFNAGEL, 1767); Lagarta Mede Palmo *Trichoplusia ni* (HUEB., 1802); e Broca da Couve *Hellula phidilealis* (WALKER, 1859) (GALLO et al., 2002).

As principais doenças enfrentadas pelos agricultores de couve são a *Alternaria* (*Alternaria brassicae*); Hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*); Míldio (*Peronospora parasítica*); Podridão Mole (*Erwinia carotovora* var. *carotovoa*), Podridão Negra (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*); e Murcha de Fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Conglutinans*). (ABCSEM, 2015; TRANI et al., 2015). A Murcha de Fusariose já causou muitos prejuízos no passado para a cultura do repolho nos Estados Unidos, no Brasil a doença já foi relatada nos estados de São Paulo e Minas Gerais (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

2.2 Bactérias endofíticas

Os micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX. Em 1866, foi relatado algumas diferenças entre esses micro-organismos e os fitopatógenos de plantas, definindo-os como assintomáticos, não produzindo, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros. A partir dessa definição esses micro-organismos passaram a ficar esquecidos até o final da década de 1970. Foi verificado nessa época que longe de serem apenas habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesses, como conferir resistência ao ataque de determinados insetos pragas e micro-organismos patogênicos, ganhando ênfase e notoriedade no meio científico (AZEVEDO, 1998).

Hallmann et al. (1997) sugeriu que através do processo evolutivo, as bactérias endofíticas seriam intermediárias entre as bactérias saprófitas e patogênicas, o autor também especulou a possibilidade das bactérias endofíticas serem mais evoluídas que as patogênicas, por conseguir se nutrir do hospedeiro sem causar sua morte. A sequência

evolutiva proposta por Djordjevic; Gabriel e Rolfe (1987) reforça essa especulação, pois a mais bem-sucedida interação entre o micro-organismos e a planta não apenas explora as fontes nutritivas dos vegetais, mas com o passar do tempo deve causar menos danos à planta.

Acredita-se que todas as espécies vegetais do planeta possuem micro-organismos associados, podendo uma determinada planta hospedar mais espécies microbianas do que outras, indicando que existe uma grande biodiversidade de fungos e bactérias endofíticas em todos os continentes (PETRINI, 1991; STROBEL; DAISY, 2003; AMATUZZI, 2014). De acordo com Azevedo (1998), esse grupo pode ser classificado conforme a sua ocorrência em um determinado hospedeiro, onde as espécies encontradas com maior frequência são classificadas como dominantes, já as espécies mais escassas são definidas como secundárias.

A relação endófito-planta ainda não tem seus mecanismos envolvidos totalmente compreendidos, porém é conhecido que as interações entre o micro-organismos endofítico podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, os micro-organismos induzem ou produzem metabólitos primários e secundários, que podem conferir mecanismos de resposta ao ataque provocado por herbívoros ou insetos e controle de micro-organismos patogênicos. Em troca, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários para à sua sobrevivência, abrigo e transferência às próximas gerações (SPECIAN et al., 2014).

Os micro-organismos endofíticos habitam em partes internas dos hospedeiros, como: folhas, ramos, raízes e sementes. De acordo com Hallmann et al., (1997) com o acúmulo de informações e determinação das funções que esses micro-organismos podem desempenhar no interior dos vegetais. Os biotecnologistas vem dando muita importância ao estudo de fungos e bactérias endofíticas que podem atuar no controle biológico de inúmeras pragas e doenças, além de promover um melhor crescimento vegetal.

A grande vantagem apresentada pelos endófitos é colonizar as plantas nos tecidos internos, o que proporciona um ambiente protegido das adversidades do meio, como o raio ultravioleta, chuvas, flutuações de temperatura, maior disponibilidade de nutrientes, evitando a competição com outros micro-organismos, como os da microbiota rizosférica (MCINROY; KLOEPPER, 1995).

De acordo com Azevedo (1998), os micro-organismos endofíticos adentram as plantas principalmente por aberturas naturais e ferimentos. Uma das principais portas de entrada mais utilizadas por esses micro-organismos são as raízes, seu próprio crescimento no solo, gera abrasões que facilitam a entrada dos endófitos. Outras portas de entrada são: estômatos, nectários, lenticelas, hidatódios e aberturas florais ou ferimentos como injúrias, tricomas quebrados, emergência de raízes laterais e feridas. As bactérias endofíticas são dependentes dessas aberturas, diferente dos fungos, que possuem estruturas que permitem a penetração direta.

Na literatura os principais gêneros de bactérias endofíticas são *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (HALLMANN et al., 1997; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002), sendo relatados principalmente no algodão (*Gossypium hirsutum*), na batata (*Solanum tuberosum*), na beterraba (*Beta vulgaris*), no milho comum e doce (*Zea mays*) e em diversas espécies de citrus (AZEVEDO, 1998), onde esse conjunto de hospedeiros formam o grupo de espécies vegetais com maior número de bactérias associadas já relatadas até hoje.

As bactérias endofíticas, possuem grande potencial para utilização na biotecnologia, para o controle biológico de doenças. Na literatura é possível encontrar uma grande diversidade de trabalhos que relatam êxito na utilização de micro-organismos endofíticos no controle de fitopatógenos. Sbravatti Júnior et al. (2013) verificou que fungos endofíticos inibiram o crescimento *in vitro* de *Botrytis cinerea* e não causaram lesões foliares em *Eucalyptus benthamii*. Sottero et al. (2006), verificou que alguns isolados de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* apresentaram competição *in vitro* contra *Fusarium* sp., de modo não determinado.

Bagnasco et al. (1998), estudando bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* obtiveram antagonismo *in vitro* contra *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Mukhopadhyay et al. (1996), estudando inúmeras estirpes associadas, verificou propriedades antifúngicas contra *Guamannomyces graminis*, *Heterobasidium annosum*, *Pythium myriotylum* e *Rhizoctonia solani*, micro-organismos infecciosos de espécies agrícolas e florestais.

Hoffmann-Hergarten, Gulati e Sikora (1998), ao estudar isolados de *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* sp. Verificou a eficiência desses no controle biológico do nematoide *Meloidogyne incognita*, quando inoculados em sementes de alface e tomate.

2.3 Promoção de crescimento por endofíticos

Os micro-organismos endofíticos apresentam potencial de promoção de crescimento para diversas espécies cultiváveis. Melo et al. (2015), verificou que isolados de actinomicetos promoveram em plantas de rúcula maior altura de plantas, número de folhas, diâmetro do coleto, fitomassa e matéria seca, além de suprimir o ataque de micro-organismos patogênicos por toda região das plantas que receberam inoculação dos actinomicetos. Essa promoção de crescimento pode acontecer por várias vias, uma delas é o potencial antagônico a fitopatógenos ou a produção de fitormônios. Diversos autores relataram a eficiência de actinomicetos no controle de micro-organismos patogênicos. Castillo (2001) constatou a eficiência de actinomicetos antagônicos à *Rhizoctonia solani*.

São diversos os exemplos de bactérias endofíticas que apresentam capacidade de promoção de crescimento em diversas culturas, como o tomate (BASHAN; SINGH; LEVANONY, 1989), rúcula (MELO et al., 2015), batata (STURZ, 1995), milho (HINTON; BACON, 1995), cana-de-açúcar (MONTALDO, 2016), arroz (HUREK et al., 1994), alface (FREITAS; MEELO; DONZELI, 2003) dentre outras.

Essa promoção de crescimento pode estar relacionada a diversos mecanismos, como: controle biológico pela competição por nutrientes com patógenos, produção de sideróforos e antibióticos (KLOEPPER et al., 1980). Produção de fitormônios, como auxina (BIANCO et al., 2006), etileno (GLICK et al., 2005), citocininas e reguladores de crescimento (SILVA et al., 2018), pelo aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio atmosférico (ANTOUN et al., 1998), e solubilização de fosfato inorgânico (SILVA et al., 2018).

De acordo com Venieraki et al. (2010), esses micro-organismos mobilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, a partir de matriz mineral do solo, para que possa ser absorvido pelo sistema radicular da planta, a síntese realizada reduz o pH do solo. Manjula e Podile (2005) ao estudar a promoção de crescimento ocasionada por *Bacillus subtilis*, verificou que a consequência seria o aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhorias das condições do solo.

Além de conferir uma maior resistência a planta as ações de estresses ambientais e contra micro-organismos patogênicos.

A tolerância à seca por esse grupo de bactérias pode ser obtida mediante vários mecanismos, como a produção de exopolissacarídeos (EPS) (NOCKER et al., 2012) e a formação de biofilme (CHANG et al., 2007). Os EPS formam o biofilme, sendo um mecanismo adaptativo durante a evolução das espécies vegetais, e os micro-organismos associados a essas plantas, adquiriram essa capacidade de tolerância.

Os exopolissacarídeos são definidos como polissacarídeos extracelulares produzidos por micro-organismos, quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio. A maioria desses micro-organismos possuem a capacidade de sintetizar polissacarídeos e excretar polímeros solúveis e insolúveis, para fora da célula, com várias funções (SEESURIYACHA et al., 2012). A produção de EPS pelos micro-organismos, interagindo com as plantas, auxiliam na sobrevivência do vegetal em condições de estresses ambientais, como por exemplo, estresse hídrico, salino e variação de temperatura (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). De acordo com Barreto et al. (2011), os EPS possibilitam à vida livre à bactéria, permite a tenha aderência e a colonização em superfícies sólidas, o envolvimento das membranas celulares contra o dessecamento, e a fixação de nutrientes próximos as bactérias.

O biofilme é definido como uma matriz com populações bacterianas aderentes umas às outras, sendo essa matriz composta por carboidratos extracelulares, proteínas e até DNA (COSTERTON et al., 1995). De acordo com Boari et al. (2009), o biofilme é outro mecanismo de tolerância ao estresse hídrico, constituído por comunidades bacterianas envoltas por substâncias exsudadas pelas próprias bactérias, sendo livres quando soltas da comunidade bacteriana, possuindo como vantagem a proteção contra agressões externas, como a falta de nutrientes e à dessecação.

A relação endófito planta pode auxiliar no sucesso da produção em campo, tanto pelo seu mecanismo de promoção de crescimento, bem como a proteção a pragas e fitopatógenos e aos efeitos abióticos que podem causar determinados estresses ao vegetal. O uso desses micro-organismos na agricultura, pode ser considerada uma ferramenta ecológica e sustentável para o agricultor substituir ou diminuir a utilização de produtos químicos na lavoura e assim garantir uma produção limpa, renovável e sustentável.

2.4 Solubilização de fosfato por bactérias endofíticas

O fósforo é um elemento essencial para as plantas, e os solos brasileiros geralmente apresentam pobreza em relação a esse mineral (BASTOS et al., 2008). Através do processo erosivo, poluição e perda em águas de drenagem, grandes quantidades de fósforo são carregadas para os rios e córregos, fazendo com que eventualmente esse elemento alcance os oceanos, onde é depositado e precipitado em sedimentos e organismos marinhos. Em virtude dessa perda, rochas fosfatadas são extraídas em larga escala para uso como fertilizante (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

Segundo Nahas, Centurion e Assis (1994), os solos intemperizados são predominantes nas regiões tropicais, o Brasil é um exemplo disso, onde seus solos têm como característica a baixa disponibilidade de fósforo nas lavouras. De modo geral, os solos agrícolas, apresentam teores totais desse nutriente variando de 200 a 3.000 mg dm⁻³, porém, menos de 0,1% dessas reservas encontra-se disponível às plantas. Sua baixa disponibilidade é considerada a principal limitação na produção agrícola em condições úmidas, tropicais e subtropicais.

Os fertilizantes solúveis, além de apresentar um alto custo e uma grande quantidade requerida, tem como problema principal que grande parte do fósforo solúvel introduzido reage com componentes do solo, formando compostos pouco disponíveis para absorção pelas plantas. Os fenômenos de fixação e precipitação de fósforo são altamente dependentes das condições edáficas, como pH, teor de umidade, temperatura e os minerais presentes no solo (WALPOLA; YOON., 2012).

O fósforo é um macronutriente de grande importância para o desenvolvimento vegetal, atuando na fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e reprodução (STAUFFER; SULEWSKI, 2004). Ao ser absorvido pelas raízes é rapidamente incorporado aos açúcares, formando ésteres de açúcar-fosfato, que são transportados radialmente nas células das raízes e liberados no xilema e floema na forma de fosfato inorgânico, o qual transita facilmente pelos vasos condutores. Na célula vegetal, é elemento estrutural dos ácidos nucleicos, transferido de energia nas ligações químicas energéticas do fosfato e pirofosfato como açúcares, com gliceraldeído e com coenzimas como AMP, ADP, ATP, UTP e GTP, além de ser regulador em diversas vias sintéticas (FURLANI, 2004).

Os micro-organismos endofíticos apresentam um papel preponderante na mineralização e solubilização de fósforo, sendo as formas orgânicas de P, mineralizadas por micro-organismos produtores das enzimas fosfatases (BRAGA, 2006). O fosfato orgânico é transformado em fosfato solúvel pela ação de fosfatases, enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfatos, liberando fosfato solúvel. As fosfatases são secretadas pelas raízes das plantas e micro-organismos do solo (NAHAS; CENTURION; ASSIS, 1994).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico (MSFI) constituem aproximadamente 5 a 10% da microbiota total dos solos, sendo suas populações consideradas superiores na rizosfera (NAHAS; CENTURION; ASSIS, 1994). Essas associações com micro-organismos solubilizadores de P estão entre os principais fatores que influenciam no potencial das espécies em absorver P do solo (SIQUEIRA; ANDRADE; FAQUIM, 2004).

Os MSFI desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfato (Ca-P, Al-P e Fe-P), considerando que o aumento na disponibilidade desse elemento, proporciona um melhor crescimento e maior rendimento das culturas (CHABOT et al., 1993). As bactérias solubilizadoras de fosfato também podem atuar sinergicamente com rizóbios, favorecendo a nodulação, já que ao disponibilizam fósforo para a planta, sendo o processo de fixação de nitrogênio, exigente em fósforo (SOUCHIE et al., 2005).

A capacidade de bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse para os microbiologistas, pois essa característica apresenta um grande potencial para utilização como promotores de crescimento vegetal. As bactérias com a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ganham importância durante o processo de colonização, pois podem colonizar inicialmente o hospedeiro e, em consequência dessa colonização, provê-lo deste mineral essencial durante seu desenvolvimento (CERIGIOLI, 2005).

A produção de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, compreende em uma técnica rotineira e de sucesso em laboratórios de microbiologia do solo, e as bactérias em geral, são um grupo de micro-organismos que estão também entre os principais responsáveis pelo mecanismo de solubilização de fosfato (GULL et al., 2004). De acordo com Kan et al. (2007), o interesse em pesquisas com rizobactérias promotoras de

crescimento de plantas tem aumentado, principalmente em decorrência da sua capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfato inorgânicos, fixação de nitrogênio atmosférico em vida livre.

Existe uma grande variabilidade de gêneros e espécies de organismos, a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico depende apenas do conhecimento de suas atividades e da capacidade de solubilização, que irá variar de acordo com o micro-organismos e as condições ambientais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das bactérias endofíticas e avaliação da solubilização de fosfato

As coletas de amostras contendo os isolados de bactérias endofíticas foram realizadas em duas cidades do semiárido alagoano: Piranhas (localizada à 272 km da capital) e Olho D'água do Casado (269 km da capital) (Figura 1). As coletas foram realizadas em parte aérea de plantas xerófitas. Em cada cidade foram selecionados dois pontos aleatórios, sendo escolhidas três cactáceas para coleta. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos de papel apropriados, para a melhor conservação do material.



Figura 1. Xerófita coletada para o isolamento de endófitos bacterianos. (Fonte: AUTOR, 2018)

No Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Alagoas, as amostras coletadas foram lavadas em água corrente e assepsiadas sequencialmente em etanol (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (1%) por três minutos, mais uma vez em etanol por 30 segundos, visando eliminar micro-organismos exógenos ao vegetal, e em seguida foi realizada a lavagem tripla em água destilada, visando eliminar os resíduos químicos da superfície do tecido vegetal. A posteriori, realizou-se a maceração do tecido vegetal e a adição em solução salina (NaCl 0,9%; 1000 ml de água destilada).

Para o isolamento dos endófitos foi utilizado o meio Tryptone Soya Agar (TSA) (10%) em placas de Petri incubados a 28°C por 72 horas. Os isolados bacterianos foram purificados pela técnica de estria composta, armazenados em tubos de ensaio inclinados

contendo meio TSA (10%) em tubos de ensaio inclinados e posteriormente foram armazenados em tubos criogênicos de 2 mL (Figura 2) contendo glicerol (50%) sob temperatura de 18° C.



Figura 2. Isolados bacterianos de cactáceas do Semiárido Alagoano. Fonte: (AUTOR, 2018)

Ao todo foram isolados 35 endófitos bacterianos, quais foram submetidos a avaliação qualitativa em meio NBRIP sólido (0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl ; 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Agar 2,0%), adicionado fosfato de cálcio (5 g L^{-1}) antes da autoclavagem e pH ajustado para 7,0. A inoculação constou de uma repicagem no centro da placa, sendo mensurado o diâmetro do halo da colônia a cada cinco dias, e no 15° dia foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, sendo a solubilização classificada em baixa solubilização ($\text{IS} < 2$), média solubilização ($2 < \text{IS} < 3$) e alta solubilização ($\text{IS} > 3$). Foram selecionados os isolados que obtiverem um índice maior ou igual a três, no 15° dia após a inoculação. O ensaio foi executado em delineamento experimental inteiramente casualizado em desenho fatorial com 3 repetições.

Dos 35 isolados de bactérias endofíticas de cactácea do semiárido alagoano, cinco foram selecionados, utilizando como critério a solubilização de fosfato (ISO31, ISO33, ISSO34, ISO48 e ISO51) para avaliação de promoção de crescimento vegetal em couve.

3.2 Verificação de capacidade de promoção de crescimento em couve

O experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia, na Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus Delza Gitaí, Rio Largo, Alagoas (latitude 09° 40' S, longitude 35° 42' W e 127,00 m de altitude), localizado em áreas de tabuleiros costeiros pertencentes ao Grupo Barreiras. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen (1948), é do tipo As, ou seja, tropical quente e úmido, com estação seca no inverno e precipitação pluviométrica média anual de 1630 mm, temperatura média anual de 24°C e umidade relativa do ar média de 79%.

O delineamento experimental utilizado foi o DIC (Delineamento Inteiramente Casualizados), em esquema fatorial 2 x 6, onde o primeiro fator representa as condições de solo (solo autoclavado e não autoclavado), e o segundo fator representa as estirpes bacterianas endofíticas, escolhidas, sendo o critério de escolha a aptidão em solubilizar fosfato *in vitro*, dentro do banco de isolados do Laboratório de Microbiologia (ISO31, ISO33, ISO34, ISO48, ISO51 e tratamento controle), constituindo 12 tratamentos e 3 repetições, resultando em 36 parcelas (Figura 3).

T3 R3	T6 R3	T4 R3	T2 R2	T6 R2	T12 T1
T7 R3	T2 R3	T9 R2	T9 R1	T12 R2	T3 R1
T11 R3	T12 R3	T8 R3	T1 R2	T2 R1	T11 T1
T9 R3	T1 R3	T5 R2	T11 R2	T7 R1	T8 R1
T10 R3	T7 R2	T10 R1	T1 R1	T8 R2	T6 R1
T5 R3	T10 R2	T5 R1	T4 R2	T4 R1	T3 R1

Figura 3. Esquema de distribuição dos tratamentos avaliados em delineamento inteiramente casualizados, onde: T1 = solo autoclavado + ISO31; T2 = solo autoclavado + ISO33; T3 = solo autoclavado + ISO34; T4 = solo autoclavado + ISO48; T5 = solo autoclavado + ISO51; T6 = solo autoclavado (controle); T7 = solo não autoclavado + ISO31; T8 = solo não autoclavado + ISO33; T9 = solo não autoclavado + ISO34; T10 = solo não autoclavado + ISO48; T11 = solo não autoclavado + ISO51; T12 = solo não autoclavado (controle).

A coleta de solo para a execução do experimento foi retirada da camada arável e peneirado afim de eliminar materiais inertes e torrões, sendo esse solo coletado do tipo latossolo amarelo coeso argiloso de textura média argilosa. Uma amostra de solo foi

enviada para o Laboratório de Solo, Água e Planta, da Universidade Federal de Alagoas, para análise química. A amostra apresentou os seguintes resultados: pH em água de 6,2; P: 80 mg/dm³; K: 113 mg/dm³; Ca 4,55 cmol_c/dm³; Mg 2,55 cmol_c/dm³; Al: 0,01 cmol_c/dm³; H+Al: 2,70 cmol_c/dm³; CTC efetiva: 7,40 cmol_c/dm³; CTC total: 10,09 cmol_c/dm³; saturação por bases: 73%; saturação de Ca; 45,1%; saturação de Mg 25,3%; e saturação de K 2,9%.

Foi realizado a assepsia das sementes de couve (99% de pureza), utilizando solução de hipoclorito de sódio à 10% (10 mL de hipoclorito de sódio e 90 mL de água destilada) (A), sendo realizada em sequência a lavagem em água corrente (B) e colocadas para secagem em papel filtro (C), conforme pode ser observado na Figura 4.

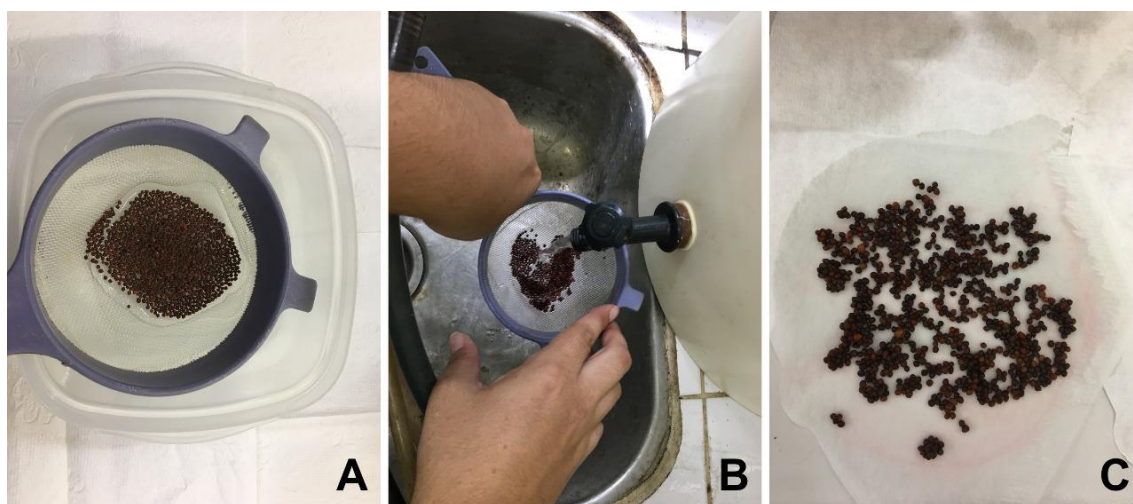


Figura 4. Assepsia das sementes de couve utilizadas para plantio. (Fonte: AUTOR, 2018).

Posteriormente a secagem foram semeadas em bandejas de 200 células, depositando em cada célula, três sementes de couve, na proporção 1:1 (solo e húmus de minhoca) a 0,5 cm de profundidade da superfície da célula. Ao vigésimo dia após o plantio, as mudas foram transplantadas, sendo retirada das células com auxílio de palheta metálica e acondicionadas em vasos de 500 mL preenchidos com solo autoclavado ou não autoclavado.

Os isolados bacterianos endofíticos que estavam armazenados em tubos criogênicos foram repicados em placas de petri, em meio N.A. sólido (ágar, peptona, cloreto de sódio e água destilada). Após o crescimento bacteriano nesse meio, os mesmos foram transferidos para tubos de ensaio com meio N.A. líquido (0,9 gramas de extrato de

carne; 1,5 gramas de peptona; 2,4 gramas de cloreto de sódio e 300 mL de água destilada), sendo posteriormente, realizada a inoculação direta no solo, com o auxílio de uma seringa descartável (Figura 5).



Figura 5. Inoculação das bactérias endofíticas em mudas de couve. Fonte: (AUTOR, 2018).

Durante a condução do experimento foram regadas diariamente as plantas no início da manhã e no final da tarde, onde, a partir da segunda semana do seu ciclo, foi acrescida mais uma lâmina de água, devido ao aumento do porte e da necessidade hídrica das plantas, mantendo sempre o solo na sua capacidade de campo. Também foi realizado desbaste, catação de plantas daninhas e o controle manual do curuquerê-da-couve (*Ascia monuste orseis*), realizando o esmagamento da lagarta e dos ovos aderidos às folhas.

Após 77 dias do plantio, as plantas de couve foram colhidas e realizada a biometria das características de interesse agrônômico, como: altura da planta (cm) (Figura 6 A), diâmetro do coleto (mm) (Figura 6 B), número de folhas, comprimento do sistema radicular (cm), biomassa (g), peso da raiz (g) e área foliar (cm²) (Figura 6 C) (Figura 6), com o auxílio do Medidor Eletrônico de Área Foliar, da marca LI-COR, modelo 3100. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa de circulação forçada de ar a 65° C por 48 horas. Após secagem, as amostras foram pesadas em balança de precisão e determinada a matéria seca da parte área (g) e matéria

seca da raiz (g). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) por meio do Software Assisat.



Figura 6. Avaliação de altura (A) e diâmetro do coleto (B) e área foliar (C) das plantas de couve inoculadas com bactérias endofíticas e cultivadas em duas condições de solo. Fonte: (AUTOR, 2018).

Através do método de coloração das células bacterianas, conhecida como técnica de Gram (1884) foi realizado para a classificação dos endófitos em gram-positivos (G+) ou gram-negativos (G-), de acordo com a estrutura e composição de sua parede celular. Os isolados utilizados no teste para verificação de promoção de crescimento (ISO31, ISO33, ISO34, ISO48, ISO51) foram esfregados em lâminas de vidro com auxílio de uma alça de platina e fixados através do calor da chama da lamparina. Posteriormente, foram tratadas com os reagentes cristal violeta a 1%, por um minuto (corante primário), lugol, por um minuto (fixador), álcool, por 30 segundos (descolorante) e fucsina, por 30 segundos (mordente). Em cada etapa da coloração, as lâminas foram lavadas com água corrente e secadas cuidadosamente com papel toalha, sendo ao final possível visualizar com o auxílio do óleo de imersão as colônias bacterianas em microscópio óptico. Foi verificado através do teste de coloração de Gram que todos os cinco isolados bacterianos estudados são gram-negativos, conforme pode ser observado na Figura 7.

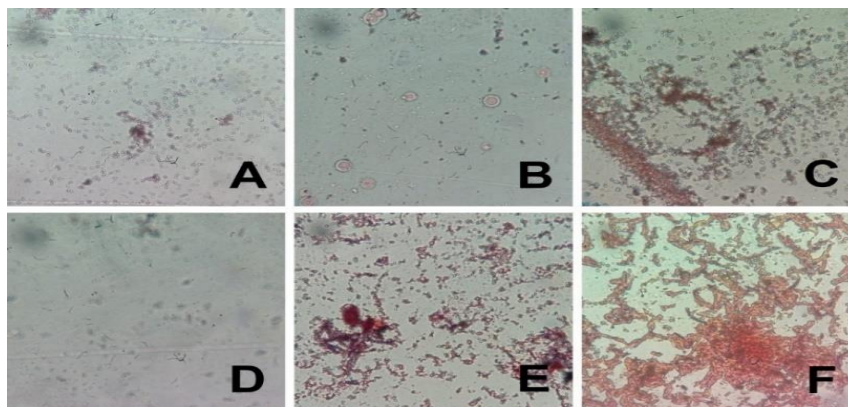


Figura 7. Visualização microscópica dos 6 isolados bacterianos endofíticos utilizados para o teste de promoção de crescimento, onde: A = ISO31; B = ISO33; C = ISO34; D = ISO48; e E = ISO51. Fonte: (AUTOR, 2018).

3.3 Análise do teor de clorofila total

Foi realizada a determinação do teor de clorofila, seguindo metodologia descrita por Arnon (1949), retirando de cada disco foliar aproximadamente 9 mm (Figura 8 A), tendo um total de três repetições por tratamento. Em seguida, realizou-se a maceração dos discos com 1 mL de acetona (80%) (Figura 8 B, C), adicionando mais 5 mL do reagente ao conteúdo vegetal, visando facilitar a diluição do tecido no meio (Figura 8 D). Após, o extrato foi filtrado (Figura 8 E, F) para retenção de resíduos sólidos que por ventura pudesse interferir no processo de leitura do equipamento, sendo depositado 1 mL da solução em microtubos (Figura 8 G) para aferição da absorbância em espectrofotômetro a 645 e 663 nm (Figura 8 H), sendo, o teor de clorofila expressos em ug/g de clorofila por folha fresca. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) por meio do Software Assistat.

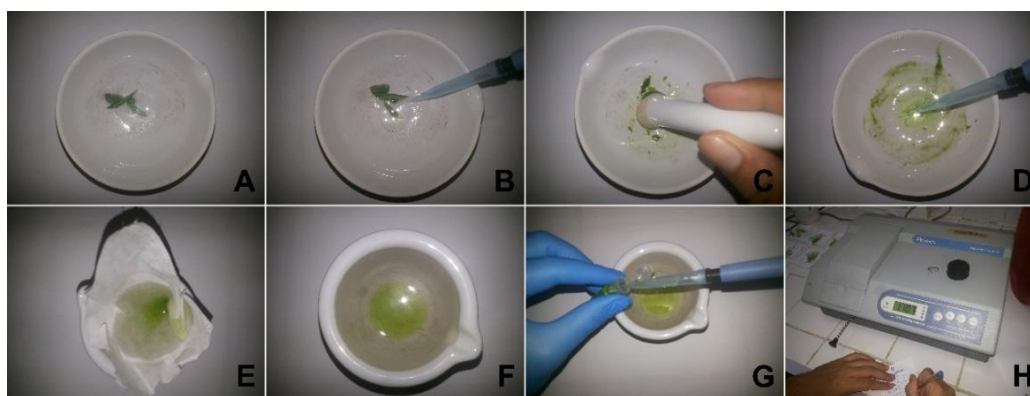


Figura 8. Determinação do índice de clorofila das amostras de couve. Fonte: (AUTOR, 2018)

3.4 Teste *in vitro* para verificação da capacidade de colonização radicular

Para o teste de crescimento e colonização radicular *in vitro*, sementes de couve foram previamente desinfetadas (asepsia em hipoclorito de sódio (1%) por um minuto seguida de dupla lavagem com água destilada) e acondicionadas em caixas Gerbox com papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada para germinação durante 72 horas no escuro. As sementes germinadas (caracterizadas pelo rompimento da raiz primária do tegumento) foram imersas por uma hora em 10 ml de solução bacteriana cultivada por 24 horas com os endófitos (ISO31, ISO33, ISO34, ISO48, ISO51) e incubadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio ágar-água (0,2%) por sete dias, com seis repetições cada, sendo o controle caracterizado pela ausência de tratamento bacteriano (Figura 9).

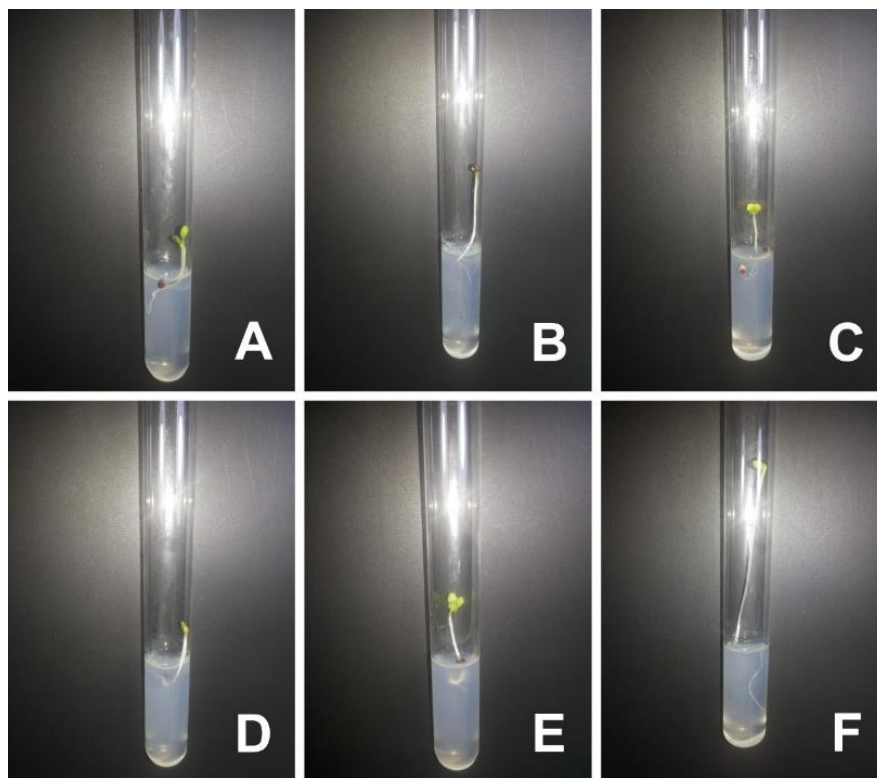


Figura 9. Teste de promoção de crescimento *in vitro* em plântulas de couve, onde: A = Controle; B = ISO31; C = ISO33; D = ISO34; E = ISO48; F = ISO51. Fonte: (AUTOR, 2018).

Após o período de incubação, foi avaliado o diagnóstico de colonização de forma visual, onde, as plântulas que apresentaram turbidez (aspecto esbranquiçado, leitoso) ao redor de suas raízes (Figura 10) foram classificadas quanto a capacidade de solubilizar fosfato, de acordo com o protocolo descrito por Silva, Romeiro e Mounteer (2003).

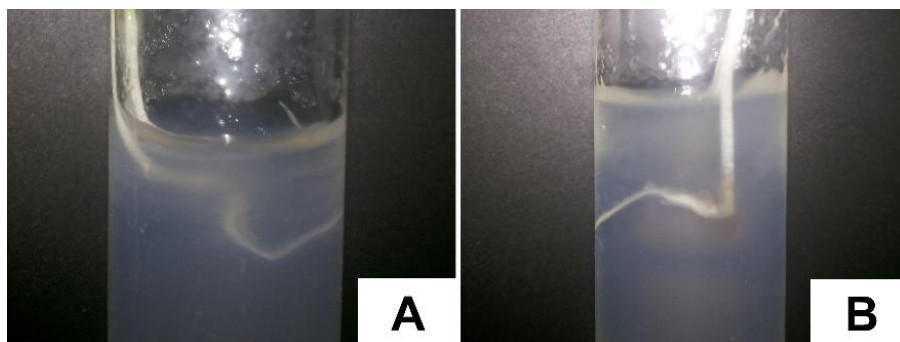


Figura 10. Indicação de colonização radicular bacteriana *in vitro* de plântulas de couve, onde: A = plântula colonizada; B = plântula não colonizada. Fonte: (AUTOR, 2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Solubilização de fosfato em meio sólido

A análise de variância, através do teste F verificou diferenças significativas, a nível de 1% de probabilidade, para os isolados bacterianos endofíticos e o tempo (5; 10 e 15 dias) para os dados de solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido.

Das 35 estirpes endofíticas, apenas 9 isolados não apresentaram halo de solubilização. Sendo todos os isolados que apresentaram o halo de solubilização, sendo considerados de elevada capacidade. Na literatura, diversos autores já verificaram a solubilização de fosfatos em meio sólido. Pedrinho et al. (2010) avaliou 58 isolados de raízes de plantas de milho, coletado com 153 dias, em Vargem Grande do Sul, São Paulo, e somente 27 demonstraram capacidade para solubilização de fosfato em meio sólido. Kishi et al. (2012) analisou 60 isolados obtidos de três pontos, em plantio de cana de açúcar, no estado de São Paulo, e constatou que apenas 10 apresentou elevada capacidade de solubilização de fosfato, 15 dias após a inoculação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2015), que ao trabalhar com potencial de bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum* e *Bacillus*, como promotores de crescimento em cana-de-açúcar, verificaram que quatro isolados se mostraram eficientes para solubilização de fosfato *in vitro* em meio NBRIP.

Montaldo (2016), ao trabalhar com 24 isolados de solo e rizosfera, coletados em áreas de usinas sucroalcoleiras, em Alagoas, verificou que apenas 4,16% não apresentaram halo de solubilização. Os demais isolados (95,84%) apresentaram a formação do halo de solubilização de fosfato, sendo apenas 4,34% destes, considerados de baixa solubilização.

Dos 26 isolados bacterianos que apresentaram capacidade para solubilização de fosfato em meio sólido, dois destacaram-se apresentando a maior eficiência de solubilização, sendo esses o ISO31 e ISO65. Na Figura 11, pode-se verificar a solubilização de fosfatos em meio sólido por diferentes isolados bacterianos.

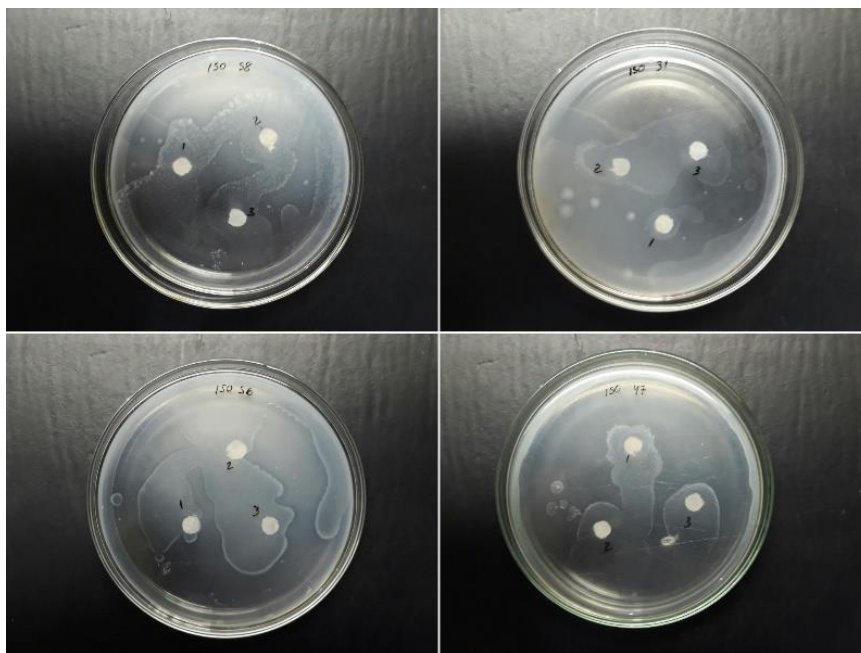


Figura 11. Solubilização de fosfatos solúveis em meio NBRIP sólidos pelas estirpes bacterianas. Fonte: (AUTOR, 2018)

Aos cinco dias de incubação, pode-se verificar a superioridade do ISO65, diferindo dos demais tratamentos e apresentando a maior média de diâmetro das colônias. O ISO31, apresentou-se como inferior ao ISO65, e superior aos demais isolados. O índice de solubilização do ISO65 foi 16,03% maior que o do ISO31. Foi possível verificar na primeira avaliação os nove isolados que não apresentaram capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido, sendo eles: ISO32, ISO35, ISO38, ISO39, ISO40, ISO42, ISO46, ISO55 e ISO60, conforme pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1. Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5, 10 e 15 dias de incubação.

Isolados	Tempo de incubação (Dias)*		
	5	10	15
ISO30	93,45 Ad	106,77 Ad	121,17 Ad
ISO31	205,85 Ab	215,65 Ab	179,67 Ac
ISO32	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO33	130,72 Ac	157,61 Ac	156,03 Ac
ISO34	137,21 Ac	106,33 Ad	126,00 Ad
ISO35	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO36	66,08 Ad	92,15 Ad	96,86 Ad
ISO37	122,89 Ac	150,71 Ac	102,08 Ad
ISO38	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO39	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO40	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO41	96,08 Ad	105,87 Ad	106,13 Ad
ISO42	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO43	112,30 Ac	143,94 Ac	148,35 Ac
ISO44	136,20 Ac	126,75 Ad	130,53 Ad
ISO45	111,48 Ac	114,65 Ad	119,89 Ad
ISO46	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO47	118,29 Ac	118,08 Ad	124,81 Ad
ISO48	136,41 Ac	128,03 Ad	125,86 Ad
ISO49	118,54 Ac	102,21 Ad	112,75 Ad
ISO50	112,69 Ac	111,39 Ad	110,18 Ad
ISO51	150,79 Ac	136,80 Ad	168,99 Ac
ISO52	120,67 Ac	141,62 Ac	136,62 Ad
ISO53	106,57 Ad	118,28 Ad	138,35 Ad
ISO54	98,21 Ad	99,10 Ad	108,38 Ad
ISO55	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO56	104,37 Ad	115,81 Ad	123,97 Ad
ISO57	114,40 Ac	119,76 Ad	101,56 Ad
ISO58	144,98 Ac	124,37 Ad	106,78 Ad
ISO59	100,85 Ad	102,80 Ad	100,38 Ad
ISO60	0,00 Ae	0,00 Ae	0,00 Ae
ISO61	80,86 Ad	92,78 Ad	104,15 Ad
ISO62	116,90 Ac	118,96 Ad	130,49 Ad
ISO63	96,56 Ad	105,94 Ad	112,19 Ad
ISO64	101,44 Ad	107,76 Ad	107,08 Ad
ISO65	245,17 Aa	184,29 Ab	184,05 Ac

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott 01 =< p < .05. Colunas - letras minúsculas Linhas - letras maiúsculas

Aos 10 dias de incubação, foi verificado um decréscimo no índice de solubilização do ISO65 e um acréscimo no índice de solubilização do ISO31, apresentando-se como semelhante. Apesar da semelhança estatística identificada pelo teste Scott-Knott aos 10 dias de incubação, pode-se verificar um aumento de 14,54% no índice de solubilização do ISO31, quando comparado ao ISO65. Os isolados ISO33, ISO37, ISO43 e ISO52, apresentaram-se como inferiores estatisticamente aos isolados (ISO31 e ISO65), porém, foram superiores aos demais tratamentos.

Aos 15 dias de incubação, foi verificado que alguns isolados (ISO33, ISO43 e ISO51), apresentaram uma maior média de índice de solubilização do que a média inicial, obtida aos 5 dias de incubação. Sendo assim, esses isolados, apresentaram-se nesse período como semelhantes ao ISO31 e ISO65. Apesar da semelhança estatística, o ISO65 aos 15 dias de incubação, apresentou-se como o isolado com maior média para solubilização de fosfato, foi observado que seu índice não variou entre o período de 10 e 15 dias de incubação, e sua maior média deve-se ao decréscimo ocorrido no período de 10 e 15 dias de incubação na taxa de solubilização de fosfato do ISO31.

De acordo com Montaldo (2016), solubilizar grandes quantidades em pouco tempo em meio NBRIP, além de manter a capacidade de solubilização constante, é uma característica de grande importância, visando a seleção de isolados que possam ser utilizados para produção de inoculantes.

Os isolados ISO34, ISO34, ISO36, ISO37, ISO41, ISO44, ISO45, ISO47, ISO48, ISO49, ISO50, ISO52, ISO52, ISO54, ISO56, ISO57, ISO58, ISO59, ISO61, ISO62, ISO63 e ISO64, apresentaram-se como intermediários, aos 15 dias de incubação. Sendo escolhido ao fim do experimento os isolados: ISO31, ISO33, ISO34, ISO48 e ISO51, para teste de promoção de crescimento em couve.

4.2 Promoção de crescimento em couve

4.2.1 Número de folhas

Por meio da análise de variância, foi verificado através do teste F, que não houve diferença estatística significativa, para a variável número de folhas, ao inocular bactérias endofíticas. A amplitude para essa variável analisada variou entre 7 a 11 folhas por

plantas. Apesar da semelhança estatística, é possível verificar que os isolados ISO31 e ISO34 apresentaram a maior média observada para a variável em questão, conforme pode ser observado na Tabela 2. Já ao analisar através do teste F, a utilização de duas condições de solo (autoclavado e não autoclavado), foi possível verificar, a nível de 5% de probabilidade diferenças significantes.

Tabela 2. Número de folhas de plantas de couve cultivadas com inoculação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Número de folhas*
Controle	9,00 a
ISO31	9,50 a
ISO33	9,16 a
ISO34	9,50 a
ISO48	9,33 a
ISO51	9,33 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar da semelhança estatística, pode-se observar que o tratamento controle apresentou a menor média para a variável estudada, apresentando um decréscimo de 5,26% na quantidade de folhas produzidas, quando comparada ao tratamento onde foi inoculado com ISO31 e ISO34, que obtiveram as maiores médias. Os tratamentos que foram inoculados com ISO48 e ISO51, apresentaram médias semelhantes, que apesar da similaridade estatística, foi superior ao tratamento controle, e superior ao tratamento ISO33, que dentre os tratamentos onde foram inoculados isolados bacterianos endofíticos, foi o que apresentou a menor média.

Tais resultados diferem dos encontrados por Barretti, Souza e Pozza (2008), que ao estudar a promoção de crescimento conferida por bactérias endofíticas em plantas de tomateiro, verificou que o isolado UFV-E49, ocasionou aumento no número de folhas, sendo superior ao tratamento controle. Oliveira et al. (2018) verificaram que a utilização de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* ocasionaram uma maior quantidade de folhas em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em relação ao tratamento onde não houve a inoculação.

Conforme pode ser observado na Tabela 3, apesar do teste F, apontar diferenças significativas, ao aplicar o teste de comparação de médias (Tukey 5%), não foi possível

observar diferenças estatísticas para as duas condições de solo utilizadas. O que indica que o aumento no número de folhas de plantas de couve, foi de forma aleatória entre as parcelas, não sendo influenciada de forma significativa pela autoclavagem do solo. Apesar da semelhança estatística, pode-se observar que o tratamento contendo solo não autoclavado, apresentou uma maior média, proporcionando um incremento de 8,64% para a variável estudada.

Tabela 3. Médias do número de folhas de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.

Condição de solo	Número de folhas*
Solo autoclavado	8,88 a
Solo não autoclavado	9,72 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.2 Área foliar

Em relação a área foliar, não foi observada diferenças estatísticas entre os tratamentos analisados, o que indica que a aplicação dos isolados endofíticos utilizados nesse experimento, não promove aumento da área fotossintética das plantas. Mesmo com a semelhança obtida pelo teste F, é possível observar que o ISO34, apresentou a maior média em relação aos demais tratamentos, apresentando um incremento de 7,67 cm² em relação ao tratamento controle.

Apesar de não diferir estatisticamente dos demais inoculados, o ISO33 apresentou a menor média entre os tratamentos, apresentando um decréscimo de 41,50 cm² em relação ao ISO34 (isolado que apresentou a maior média dentre os tratamentos), conforme podemos observar na Tabela 4. Tais resultados se mostraram diferentes ao obtido por Barretti, Souza e Pozza (2008), que verificou que o isolado bacteriano endofítico UFV-E49 proporciona maior crescimento em área foliar para plantas de tomate em relação ao tratamento controle.

Oliveira et al. (2018), observaram resultados semelhantes ao trabalhar com a eficiência de bactérias endofíticas associadas a extrato indutor de enraizamento natural na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo a utilização dos isolados endofíticos não ocasionando incremento significativo na área foliar.

Tabela 4. Médias de área foliar (cm²) de plantas de couve cultivadas com aplicação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Área foliar (cm ²)*
Controle	233,83 a
ISO31	241,33 a
ISO33	200,00 a
ISO34	241,50 a
ISO48	209,83 a
ISO51	211,66 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação as condições de solo que foram cultivadas as plantas de couve, não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos, porém, é possível observar na Tabela 5, que o tratamento contendo solo autoclavado, mesmo não diferindo estatisticamente do tratamento com solo não autoclavado, apresentou uma maior média, apresentando um incremento de 4,61 cm².

Tabela 5. Médias de área foliar (cm²) de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.

Condição de solo	Área foliar (cm ²)*
Solo autoclavado	225,33 a
Solo não autoclavado	220,72 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.3 Altura de plantas

Para a variável altura de plantas, foi possível verificar pelo teste F, que houve diferença significativa, a nível de 5% de probabilidade, para a utilização dos isolados bacterianos endofíticos inoculados. O teste F não verificou diferenças significantes para a condição de solo e a interação entre os isolados bacterianos endofíticos e a condição de solo.

Foi verificado através do teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade, a superioridade do ISO31 em relação ao tratamento controle, ISO33 e ISO51, conforme pode-se observar na Tabela 6. A inoculação de bactérias endofíticas ISO31 proporcionaram incremento significativo no que diz respeito a variável altura de plantas,

como observado nas avaliações, foi possível verificar uma expressão superior em relação ao tratamento controle, proporcionando um incremento de 16,51%. Os isolados ISO34 e ISO48, apresentaram-se como intermediários, apresentando semelhança estatística com o ISO31, e com os isolados ISO33 e ISO51 (que apresentaram as menores médias dentro dos tratamentos onde realizou-se a inoculação).

A altura de plantas é uma característica morfológica bastante importante para o bom estabelecimento das culturas em campo, tendo em vista que o crescimento irregular do stand pode ocasionar diferenças do padrão de produção, sendo as plantas de maior porte, apresentando vantagens em relação as de menor estatura, principalmente por conseguirem captar maior quantidade de energia solar, para transformação da energia luminosa em energia química, que é essencial para o seu metabolismo. As plantas de menor estatura podem sofrer com o sombreamento das mais altas, estimulando o estiolamento.

Tabela 6. Médias de altura de plantas de couve cultivadas com aplicação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Altura de plantas (cm)*
Controle	28,31 b
ISO31	33,91 a
ISO33	28,38 b
ISO34	30,78 ab
ISO48	31,67 ab
ISO51	28,31 b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O isolado ISO31, que apresentou a maior média para altura de plantas de couve, foi um dos isolados no teste de solubilização de fosfato *in vitro*, que apresentou maior capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em meio NBRIP, sendo considerado de elevada capacidade em solubilizar fosfato. O aumento no porte das plantas de couve, pode estar relacionado com solubilização e disponibilização desse nutriente para as plantas.

O fósforo é de grande importância para o metabolismo vegetal, atuando na fotossíntese, armazenamento e transferência de energia. De acordo com Furlani (2004),

ao ser absorvido pelo sistema radicular, o nutriente é rapidamente incorporado aos açúcares. Na célula vegetal, é elemento estrutural dos ácidos nucleicos, elemento transferido de energia nas ligações químicas energéticas do fosfato e pirofosfato como açúcares, com gliceraldeído e com coenzimas como AMP, ADP, ATP, UTP e GTP, além de ser regulador em diversas vias sintéticas

Resultados semelhantes foram encontrados por Melo et al. (2015) ao estudar o potencial de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em rúcula, obteve uma maior altura de plantas com a inoculação dos ACT1, ACT2, ACT3 e ACT4 em relação ao tratamento controle. Assumpção et al. (2009), encontrou resultados diferentes ao estudar a diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja, verificou que o isolado 24E (38) *Ochrobactrum sp*, apresentou a maior média de altura de plantas de soja aos 35 dias, porém, apresentou semelhança estatística ao tratamento controle.

Ao analisar a condição de solo, foi verificado através do teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade, que não houve diferenças estatísticas. Apesar da semelhança, pode-se observar na Tabela 7, que o tratamento onde utilizou-se solo não autoclavado, apresentou uma maior média, porém, um incremento de apenas 8 cm na altura das plantas.

Tabela 7. Médias de altura de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.

Condição de solo	Altura de plantas (cm)*
Solo autoclavado	30,19 a
Solo não autoclavado	30,27 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A altura das plantas é uma variável que pode vir a sofrer interferências para a cultura da couve por parte da microbiota edáfica nativa, que por meio de exsudação de compostos naturais, podem ocasionar efeitos reversos a promoção de crescimento, inibindo a atividade das bactérias endofíticas.

Resultados diferentes foram obtidos por Sugai, Collier e Saggin-Júnior (2011), que ao trabalharem com duas condições de solo (autoclavado e não autoclavado), para produção de mudas de angico vermelho, observaram um melhor crescimento de mudas quando realizado a autoclavagem do solo. Araújo e Guerreiro (2010), verificaram em

análise de bioprospecção de promoção de crescimento por *Bacillus* em plantas de milho, a proporção de maior altura, maior número de folhas, maior produção de biomassas com a utilização da autoclavagem do solo.

4.2.4 Diâmetro do coleto

Foi verificado na análise de variância, através do teste F, que não houve diferença estatística significativa para o diâmetro do coleto das plantas de couve, inoculadas com os diferentes isolados de bactérias endofíticas e cultivadas em solo autoclavado e não autoclavado. Esses dados indicam que o crescimento do diâmetro do coleto de plantas dessa espécie independem da aplicação dos isolados bacterianos endofíticos utilizados e da utilização de solo autoclavado. Isso também é um reflexo da ausência de outros organismos que possam interferir na ação dos endofíticos.

O tratamento controle, apesar de não diferir estatisticamente dos demais tratamentos, apresentou-se com a maior média para o diâmetro do coleto, apresentando um incremento de 0,51 mm no diâmetro do coleto em relação ao tratamento ISO48 (que apresentou a menor média). O isolado ISO51, apesar de não diferir estatisticamente dos demais isolados, apresentou a maior média dentre os tratamentos onde foi inoculado com algum isolado endofítico, conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8. Diâmetro de coleto (mm) de plantas de couve cultivadas com inoculação de diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Diâmetro do coleto (mm)*
Controle	3,78 a
ISO31	3,36 a
ISO33	3,35 a
ISO34	3,38 a
ISO48	3,27 a
ISO51	3,50 a

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados diferentes foram obtidos por Melo et al. (2015), que ao estudar a promoção de crescimento em rúcula (*Eruca sativa* L.) promovidas por actinomicetos

(bactérias Gram-negativas), isoladas de compostagens e ambientes extremos, verificou um maior diâmetro do coleto nas plantas que foram inoculadas com os actinomicetos, sendo todos esses, superiores ao tratamento controle.

Apesar de não diferirem estatisticamente, de acordo com o teste F, pode-se observar que a utilização de solo autoclavado para cultivo de couve, ocasionou um incremento de 0,25 milímetros no diâmetro de coleto, conforme observa-se na Tabela 9.

Tabela 9. Diâmetro do coleto (mm) de plantas de couve cultivadas em duas diferentes condições de solo.

Condição de solo	Diâmetro do coleto (mm)*
Solo autoclavado	3,56 a
Solo não autoclavado	3,31 a

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.5 Biomassa das plantas

Ao analisar a biomassa das plantas, não foi verificado diferenças estatísticas na utilização de estirpes bacteriana endofítica, porém, foi observado a nível de 5% probabilidade, diferenças estatísticas significativas em relação as duas condições de solo.

Apesar da semelhança indicada pela análise de variância, pode-se verificar na Tabela 10, que o tratamento onde foi inoculado com ISO31, apresentou a maior média para biomassa de plantas de couve, apresentando um incremento de 10,14% em relação ao tratamento ISO51 (tratamento que apresentou a menor média).

Tabela 10. Médias da biomassa de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Biomassa (g)*
Controle	9,22 a
ISO31	9,27 a
ISO33	8,58 a
ISO34	8,94 a
ISO48	8,55 a
ISO51	8,33 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Barretti, Souza e Pozza (2008), ao estudar 150 isolados de bactérias endofíticas coletadas de folhas, caules e raízes de tomateiros saudáveis, destacaram 53 quanto a habilidade em promover crescimento em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). O isolado bacteriano endofítico EFV-E49, verificou superioridade da utilização do mesmo em relação ao tratamento controle, obtendo um aumento no peso da biomassa de 42,40%. Melo et al. (2015), ao estudar o potencial para promoção de crescimento de seis isolados de actinomicetos encontrados em compostagens, e ambientes extremos, verificou que a utilização do ACT3 apresentou uma superioridade em relação ao tratamento controle.

Foram verificadas diferenças estatísticas significativas para a condição de solo. O tratamento onde foi realizado autoclavagem do solo, apresentou uma superioridade estatística em relação ao tratamento com solo não autoclavado, podendo ser observado um incremento de 10,83% no peso de matéria fresca de plantas de couve.

Tabela 11. Médias da biomassa de plantas de couve cultivadas em duas condições distintas de solo.

Condição de solo	Biomassa (g)*
Solo autoclavado	9,32 a
Solo não autoclavado	8,31 b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Mantovanello e Mello (1994), ao utilizar com rizobactérias do gênero *Pseudomonas*, e verificar o comportamento para duas condições de solo (autoclavado e não autoclavado), obtiveram aumentos significativos no peso seco da parte aérea e raízes de plântulas de tomateiro, em solo não autoclavado. Ao utilizar solo autoclavado, aumentos foram de 138,5 e 119%.

Silva Júnior et al. (2012) em estudo sobre os efeitos da autoclavagem do solo na promoção de crescimento de mudas de melão (*Cucumis melo* L.) observou a maior produção de biomassa de parte aérea em plantas cultivadas em solo esterilizado do que em solo não estéril, sendo mensurado o incremento de 9,27 g da condição de solo nessa variável, resultado convergente ao obtido com plantas de couve.

O peso de matéria fresca das plantas de couve é uma característica que pode sofrer interferências devido a comunidade microbiana nativa, que através da exsudação de

compostos naturais podem ocasionar efeito reverso, causando inibição da atividade de bactérias endofíticas, ou até mesmo prejudicando o bom estabelecimento da planta.

4.2.6 Matéria seca

Em relação a matéria seca foram verificadas, de acordo com o teste F, diferenças estatísticas, a nível de 1% de probabilidade, em relação a condição de solo. Não foram identificadas diferenças significativas em relação aos diferentes isolados bacterianos endofíticos, nem para a interação entre os endofíticos e a condição de solo.

Apesar do teste F indicar semelhança estatística entre os tratamentos, pode-se verificar na Tabela 12, que o tratamento onde foi inoculado o ISO31 apresentou a maior média para matéria seca das plantas de couve, apresentando um incremento de 13,11% em relação ao tratamento controle (que apresentou a menor média entre os tratamentos). Apesar da semelhança estatística, pode-se observar que o tratamento ISO33, foi o que apresentou a menor média de peso da matéria seca, quando comparado com os demais tratamentos que receberam inoculação de algum isolado endofítico.

Tabela 12. Matéria seca de couve inoculada com diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Matéria seca da parte aérea (g)*
Controle	1,06 a
ISO31	1,22 a
ISO33	1,08 a
ISO34	1,16 a
ISO48	1,16 a
ISO51	1,21 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados diferentes em relação a promoção de crescimento por bactérias endofíticas foram encontrados por Melo et al. (2015), verificaram aumento significativo na fitomassa de plantas de rúcula, inoculadas com actinomicetos encontrados em compostagens e ambientes extremos, sendo todos os isolados estudados superior ao tratamento controle. Barretti, Souza e Pozza (2008), ao inocular o endofítico EFV-E49,

em plantas de tomate, verificou superioridade da utilização do mesmo em relação ao tratamento controle, obtendo um aumento na matéria seca da parte aérea de 61,64%.

Para a condição de solo, foi verificado através do teste de média (Tukey 5%), que o tratamento onde foi realizado a autoclavagem do solo, apresentou uma superioridade estatística em relação ao solo não autoclavado, sendo observado um incremento de 21,09% no peso da matéria seca da parte aérea de plantas de couve, conforme pode-se observar na Tabela 13.

Tabela 13. Médias da matéria seca da parte aérea de plantas de couve, cultivadas em duas condições distintas de solo.

Condição de solo	Matéria seca da parte aérea (g)*
Solo autoclavado	1,28 a
Solo não autoclavado	1,01 b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O peso de matéria seca da parte aérea de plantas de couve é uma variável que pode sofrer influência devido a microbiota do solo, que através de exsudatos de compostos naturais, podem causar antagonismo ou inibição da atividade endofítica, ou até mesmo prejudicar o desenvolvimento vegetal.

4.2.7 Comprimento radicular

Em relação ao comprimento do sistema radicular, foi verificado por meio de análise de variância (teste F 5%) diferenças estatísticas significativas na utilização dos diferentes isolados endofíticos. Em relação as duas condições de solo utilizados nesse experimento, não foi observada diferenças em relação ao comprimento radicular. Não foi verificada diferenças para a interação entre os isolados bacterianos e a condição de solo.

O teste F indicou que os diferentes isolados diferem estatisticamente entre si, porém, não foi possível verificar diferenças estatísticas ao aplicar o teste de média (Tukey a 5% de probabilidade), indicando que o aumento do comprimento radicular das plantas de couve, foi de forma aleatória entre as parcelas, não sendo influenciada pelos isolados bacterianos utilizados nesse experimento.

Apesar da semelhança obtida através do teste de média, pode-se verificar na Tabela 14, que o isolado bacteriano que apresentou a maior média de comprimento radicular foi o ISO33, que obteve um incremento de 21,70% em relação ao tratamento controle, que por sua vez, apresentou a menor média dentre os tratamentos. Apesar da semelhança estatística, observa-se que o ISO34, foi o tratamento dentre os que receberam inoculação, que apresentou a menor média, apresentando um decréscimo de 15,16%, em relação ao ISO48.

Os isolados bacterianos utilizados para inoculação nas plantas de couve, são considerados de elevada capacidade em solubilizar fósforo, dessa forma, as plantas que receberam inoculação direta foram providas desse nutriente. É comum e esperado que a avaliação do comprimento do sistema radicular não apresente diferenças significativas, com superioridade para os tratamentos que receberam inoculação, tendo em vista que o tratamento controle, desprovido desse nutriente, irá pivotar em busca desse elemento essencial.

Tabela 14. Comprimento do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Comprimento sistema radicular (cm)*
Controle	18,33 a
ISO31	21,33 a
ISO33	23,41 a
ISO34	19,86 a
ISO48	22,70 a
ISO51	22,65 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados são semelhantes aos obtidos por Melo et al. (2015), que verificou que a utilização de bactérias, encontradas em compostagem e ambientes extremos, não provocou incremento no comprimento radicular em rúcula.

Em relação à condição de solo, apesar de semelhantes entre si, onde é possível observar que o tratamento contendo solo não autoclavado, apresentou uma maior média

em relação ao solo autoclavado, porém, esse incremento no comprimento do sistema radicular foi de apenas 1,61 cm (Tabela 15).

Tabela 15. Médias do comprimento do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.

Condição de solo	Comprimento sistema radicular (cm)*
Solo autoclavado	20,58 a
Solo não autoclavado	22,19 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.8 Peso úmido do sistema radicular

Em relação ao peso úmido do sistema radicular, o teste F indicou semelhança estatística entre os endófitos bacterianos utilizados e as duas condições de solo impostas as parcelas, não foi constatada diferenças para a interação entre os fatores. Observa-se na Tabela 16, que embora os tratamentos sejam semelhantes, de acordo com o teste de análise de variância, o ISO33 apresentou a maior média para peso úmido do sistema radicular, ocasionando um incremento de 3,98 gramas, em relação ao tratamento controle e 4,38 gramas, em relação ao ISO31 (tratamento que obteve a menor média).

Tabela 16. Médias do peso úmido do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Peso úmido de raiz (g)*
Controle	7,68 a
ISO31	7,28 a
ISO33	11,66 a
ISO34	6,88 a
ISO48	10,73 a
ISO51	10,91 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar da semelhança entre as duas condições de utilizadas, pode-se observar que o tratamento contendo solo não autoclavado apresentou uma maior média para o peso de

matéria fresca do sistema radicular, apresentando um incremento 1,20 gramas, conforme pode-se verificar na Tabela 17.

Tabela 17. Peso úmido do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições distintas de solo.

Condição de solo	Peso úmido de raiz (g)*
Solo autoclavado	8,59 a
Solo não autoclavado	9,79 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.9 Matéria seca do sistema radicular

Em relação ao peso da matéria seca do sistema radicular, o teste F, indicou que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si em relação aos isolados bacterianos endofíticos e a condição de solo, o teste de análise de variância não verificou diferenças para a interação entre os fatores.

Apesar da semelhança estatística apontada pelo teste de análise de variância, pode-se verificar na Tabela 18, que o tratamento onde foi inoculado com ISO51, apresentou a maior média para a variável analisada, apresentando um incremento de 2,58 gramas em relação ao tratamento controle, e de 2,75 gramas em relação ao ISO34 (tratamento que apresentou a menor média).

Tabela 18. Médias da matéria seca do sistema radicular de couve inoculadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Matéria seca do sistema radicular (g)*
Controle	2,29 a
ISO31	2,99 a
ISO33	4,63 a
ISO34	2,12 a
ISO48	3,62 a
ISO51	4,87 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tais resultados diferiram dos encontrados por Frommel, Nowak e Lazarovits (1991), que verificou que o isolado não fluorescente de *Pseudomonas sp.* PsNJ, induziu um aumento significativo no peso da matéria seca de raízes de batatateira (44% a 211%).

A Tabela 19 apresenta as médias de peso da matéria seca do sistema radicular, das plantas de couve, cultivadas em solo autoclavado e não autoclavado. Pode-se verificar que a utilização do solo autoclavado apresentou uma maior média, porém, o incremento foi mínimo, de apenas 0,03 gramas.

Tabela 19. Matéria seca do sistema radicular de plantas de couve cultivadas em duas condições de solo.

Condição de solo	Matéria seca do sistema radicular (g)*
Solo autoclavado	3,43 a
Solo não autoclavado	3,40 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Análise do teor total de clorofila das plantas de couve

Na análise do teor de clorofila das plantas de couve, foi observado por meio do teste F, que houve diferença significativa, a nível de 1% de probabilidade, para a utilização dos isolados bacterianos endofíticos e para a condição de solo. Não foi verificado diferenças estatísticas na interação entre os isolados bacterianos e a condição de solo.

Ao aplicar o teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade, foi verificado que o tratamento ISO34 apresentou a maior média para o teor de clorofila ($\mu\text{g} \cdot \text{g}$ de matéria fresca), porém, o mesmo foi semelhante ao tratamento controle, que apresentou um decréscimo de apenas 2,09% em relação em relação ao ISO34. O tratamento inoculado com ISO31, apresentou a menor média, diferindo dos demais tratamentos, exceto do ISO51, que apresentou-se como intermediário, apresentando semelhança a todos os tratamentos. Ao comparar o ISO34 com o ISO31, pode-se verificar o incremento de 23,85% no teor total de clorofila, conforme pode-se observar na Tabela 20.

Tabela 20. Teor de clorofila total ($\mu\text{g.g}$ de matéria fresca de folha⁻¹) em plantas de couve inoculadas com bactérias endofíticas.

Isolados	Teor de clorofila total ($\mu\text{g.g}$)*
Controle	37,92 ab
ISO31	29,49 c
ISO33	35,64 ab
ISO34	38,73 a
ISO48	32,80 bc
ISO51	34,54 abc

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação as duas condições de solo utilizadas nas plantas de couve, foi verificado através do teste de Tukey (5%), que o tratamento onde não foi realizado a autoclavagem do solo, apresentou uma superioridade estatística em relação ao solo autoclavado, apresentando incremento de 17,36% no teor de clorofila total, conforme pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 21. Teor de clorofila total ($\mu\text{g. g}$ de matéria fresca de folha⁻¹) em plantas de couve cultivadas sob duas condições de solo.

Condição de solo	Teor de clorofila total ($\mu\text{g. g}$)*
Solo autoclavado	31,54 b
Solo não autoclavado	38,17 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A utilização de duas condições diferentes de solo (autoclavado e não autoclavado) visou eliminar micro-organismos presentes na microbiota edáfica do solo utilizado, que pudessem interferir no objetivo de estudo, no caso a ação de promoção de crescimento das bactérias endofíticas. A utilização do tratamento com a não autoclavagem do solo, visou verificar, se a inoculação das bactérias endofíticas, iria ser comprometida quanto a sua capacidade de promover crescimento na cultura estudada, o que não aconteceu, para a maioria dos parâmetros analisados.

Em relação ao teor de clorofila total, foi verificado uma superioridade estatística do solo não autoclavado em relação a autoclavagem do solo, esse resultado verificado, pode ser resposta a ação de algum micro-organismo da comunidade edáfica do solo, que

possa ter desempenhado função de solubilização de nitrogênio. Tendo em vista que a molécula de clorofila em sua constituição há um íon de magnésio coordenado por quatro átomos de nitrogênio.

3.4 Capacidade de colonização radicular *in vitro*

O teste *in vitro* para verificar o potencial de colonização radicular dos isolados bacterianos, indicou que o ISO31 e ISO34 apresentaram colonização radicular em todas as parcelas experimentais de seus tratamentos, proporcionando às plântulas o suprimento de fósforo para realização de suas atividades metabólicas. Os demais isolados estudados, apresentaram capacidade de colonização em raízes de plântulas de couve, conforme pode ser observado na Tabela 22. O ISO48, dentre os isolados estudados, foi o que apresentou a menor porcentagem de colonização. O tratamento controle (onde as plântulas ficaram embebidas em água destilada), não obtiveram colonização radicular.

Tabela 22. Porcentagem de colonização radicular das plântulas de couve inoculadas com os isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Colonização radicular (%)*
Controle	0
ISO31	100
ISO33	83,33
ISO34	100
ISO48	50
ISO51	66,70

Silva et al. (2015) ao estudarem bactérias endofíticas associadas à cana-de-açúcar descrevem que a utilização destas proporcionou a colonização radicular, bem como o desenvolvimento do enraizamento e brotação em gemas de cana-de-açúcar. Essa relação simbiótica é de fundamental importância para o micro-organismo interagir com a planta, se estabelecer na região rizosférica, poder sobreviver, multiplicar e competir com a comunidade microbiana nativa.

A verificação da colonização é de grande importância ao se trabalhar com bactérias promotoras de crescimento, pois comprova que o micro-organismos estudado apresenta capacidade de colonização radicular, pois um dos grandes problemas relatados na literatura é a inconstância de resultados ao se trabalhar com bactérias promotoras de

crescimento. De acordo com Suslow (1982), uma das hipóteses para a falta de constância seria a inability dos micro-organismos introduzidos se moverem do local de inoculação e se estabelecerem na rizosfera e superfície da raiz.

As plântulas de couve que não receberam inoculação das bactérias endofíticas apresentaram um maior crescimento radicular de parte aérea, em relação aos tratamentos onde ocorreu a microbiolização, conforme pode ser observado na Figura 12 e 13. Esse maior crescimento, ocorre em decorrência da ausência de nutrientes essenciais no meio de cultura, onde a raiz primária necessita pivotar de forma acelerada em busca desses nutrientes, buscando seu estabelecimento.

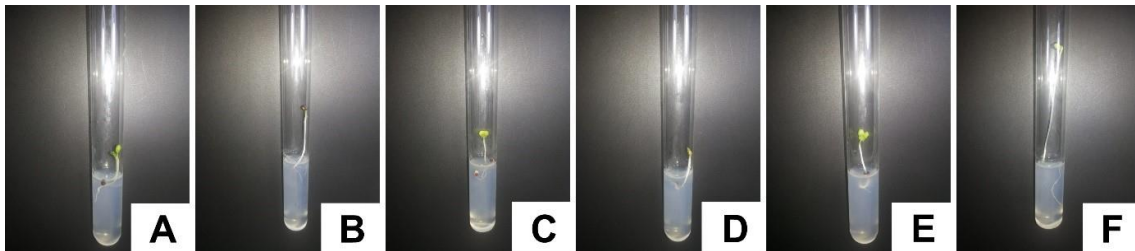


Figura 12. Teste *in vitro* de colonização radicular bacteriana de plântulas de couve, onde: A = ISO31; B = ISO 33; C = ISO 34; D = ISO 48; E = ISO 51; F = tratamento controle. Fonte: (AUTOR, 2018).

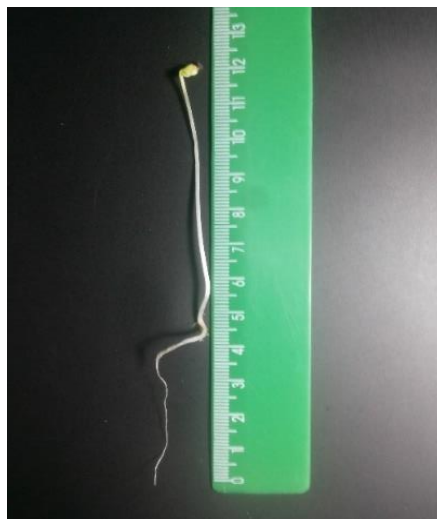


Figura 13. Plântula de couve não microbiolizada (tratamento controle)

A colonização do sistema radicular é um processo que envolve a capacidade da bactéria em sintetizar metabólitos e mecanismos de migração, aderência, penetração e distribuição nas raízes (JHA; JHA; MEHROTRA, 2013). De acordo com Silva et al. (2018), a formação de expolissacarídeos e de biofilme, são mecanismos bacterianos

bastante conhecidos e que desempenham papel fundamental no processo de colonização radicular.

A produção de exopolissacarídeos por meio da interação micro-organismo-planta, pode formar o biofilme, que irá limitar a difusão de compostos secretados pelo sistema radicular e também pelas bactérias, possibilitando uma melhor aderência e colonização às superfícies nos quais os nutrientes se acumulam, além de favorecer a fixação de nutrientes e minerais, reter umidade e proteger a planta contra estresses ambientais, como, dessecação, salinidade, variação de temperatura. Vem sendo verificado que o acúmulo ou formação dos EPS tende a aumentar a partir do momento em que o estresse salino ou outro tipo de estresse se expressa de forma pronunciada no ambiente (SANTOS; ESPOSITO, 2014).

Os EPS bacterianos possuem um papel importante, tanto para sobrevivência quanto para a associação desta com a planta, auxiliando na adesão da célula às superfícies, na concentração de nutrientes, evitam a dessecação, evitam contato direto com hospedeiro e na proteção contra moléculas tóxicas (SUTHERLAND, 2001).

5. CONCLUSÕES

A maioria dos isolados bacterianos endofíticos coletados no semiárido de Alagoas, apresentaram capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido, sendo o ISO31 e ISO65, os que obtiveram os maiores índices de solubilização ao término do ensaio, todos os isolados que apresentaram halo de solubilização foram considerados de elevada capacidade de solubilização.

Os isolados inoculados na cultura de couve, não apresentaram capacidade de promotores de crescimento para maioria das variáveis estudadas, sendo apenas verificado promoção de crescimento para a altura das plantas, incrementado pelo ISO31. A análise do teor de clorofila, verificou que o ISO34 apresentou maior média de área foliar, porém não diferiu estatisticamente do tratamento controle.

A utilização de solo autoclavado não apresentou eficiência à ação das bactérias endofíticas, apresentando incremento significativo apenas para biomassa e matéria seca da parte aérea. Em relação ao teor de clorofila a utilização de solo não esterilizado apresentou uma maior área foliar, provavelmente, relacionado a ação da microbiota edáfica nativa.

No ensaio *in vitro* foi constatada a capacidade dos isolados estudados quanto a colonização radicular, sendo ISO31 e ISO34, os isolados que obtiveram maiores porcentagem de colonização.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **Manual Técnico para cultivo de hortaliças**, 3ª edição. Campinas, 2015.
- AMATUZZI, R. F. **Fungos endofíticos do morangueiro e potencial de controle biológico de *duponchelia fovealis zeller* (lepidoptera: crambidae)**. 2014, 52 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- ANTOUN, H. et al. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and Soil**, v. 204, n. 204, p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p.837-844, 2010.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1998.
- BAGNASCO, P. et al. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agentes against forage legume root pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10, p. 311-321, 1998.
- BARRETO, M. C. S. et al. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 17, n. 2/4, p. 221-227, 2011.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasiliense* Cd to growth of tomato seedling is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 8, p. 2429-2434, 1989

BASTOS, A. L. et al. Influência de doses de fósforo de doses de fósforo no fluxo difusivo em solos de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.2, p.136-142, 2008.

BIANCO, C. et al. Indol-3-acetic acid improves *Escherichia coli* defenses to stress. **Archives of Microbiology**, v.185, n. 5, p. 373-382, 2006.

BOARI, C. A. et al. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BRAGA, G. **Eficiências de fosfatos com solubilidade variável em água em solos com capacidade de fixação de fósforo induzida**. 83 f. 2006. Dissertação (Programa de solos e nutrição de plantas) – Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

CASTILLO, E. C. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizosfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kuhn *in vitro*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 19, n. 2, p. 203-207, 2001.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**.149, 2005. Tese (Programa de pós-graduação em genética e evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Simulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 941-947, 1993.

- CHANG, W. S. et al. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under waterlimiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.22, p.8290-8299, 2007.
- COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.
- DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. Rhizobium – the refined parasite of legumes. **Annual Review of Phytopatology**, v. 25, n. 1, p. 145-168, 1987.
- DJOUSSÉ, L. et al. Fruit and vegetable consumption and LDL cholesterol: The national heart, lung, and blood Institute Family Heart Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 2, p. 213-217, 2004.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2013.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura: Cultura e comercialização de hortaliças**. Agronômica Ceres. São Paulo. cap. 2, v. 2, p. 33-75, 1982.
- FREITAS, S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.
- FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v. 96, n. 3, p. 928-936, 1991.
- FURLANI, A.M.C. **Nutrição mineral**. In: KERBAUY, G.B. (Org). Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 40-75, 2004.
- GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**, n° 2, ed. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GLICK, B. R. et al. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.

- GULL, M. et al. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 6, p. 623-628, 2004.
- HALLMANN, J. et al Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.
- HINTON, D. M.; BACON, C. W. Enterobacter cloaca eis na endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v. 129, n. 2, p. 117-125, 1995.
- HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M.K.; SIKORA, R.A. Yield response and biological control of Meloidogyne incognita on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Plant Diseases**, v. 5, n. 4, p. 349-358, 1998.
- HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of Azoarcus sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of bacteriology, Am Soc Microbiol**, v. 176, n.7, p. 1913-1923, 1994.
- IGUAL, J. M. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie, EDP Sciences**, v. 21, n. 6-7, p. 561-568, 2001.
- JHA, P. N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture Greener. **Journal of Agricultural Sciences**, v.3, n.2, p.73-84, 2013.
- KAN, F.L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 103-115, 2007.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 1, p. 183-191, 2013.
- KOEPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. Mexico, DF: Fondo de Cultura Econômica, 478p, 1948.

INUI-KISHI, R. N. et al. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation.

Journal of Engineering and Applied Sciences, v. 7, n. 11, p. 1446-1454, 2012.

KLOEPPER, J. W. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, n. 5576, p. 885-886, 1980.

MADEIRA, N. R.; REIFSCHNEIDER, F. V. B.; GIORDANO, L. B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica.

Horticultura Brasileira, v. 26, n. 4, p. 428-432, 2008.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 21, n. 6, p. 1057-1062, 2005.

MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p.123-126, 1994.

MASSOLA JÚNIOR, M. S.; KRUGNER, T. L. **Fungos fitopatogênicos**. In:

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs). Manual de Fitopatologia. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, p. 149-206.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 895-901, 1995.

MELO, A. L. S. et al. Prospecção e isolamento de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 31-34, 2015.

MONTALDO, Y. C. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal**. 101 f. 2016. Tese (Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

- MUKHOPADHYAY, N. K. et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia, Dordrecht**, v.134, n. 3, p.151-159, 1996.
- NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 1994.
- NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 94-100, 1999.
- NOCKER, A. et al. Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 2, p. 86-95, 2012.
- NOVO, M. C. S. S. et al. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 321-325, 2010.
- OLIVEIRA, V. S. et al. Eficiência de bactérias endofíticas associadas a extrato indutor de enraizamento natural na cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 3, n. 1, p. e6681, 2018.
- PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.
- PETRINI, O. **Fungal endophyte of tree leaves**. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York. Springer Verlag, p. 69-72, 1991.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SANTOS, A. F. J.; ESPOSITO, E. **Interação entre micro-organismos x biotecnologia socio-ambiental**. n. 1, ed. São Paulo: Ícone. 680 p., 2014.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A. et al. Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Revista Floresta**, v. 43, n. 1, p. 145-151, 2013.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Censo Agropecuário**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 777p., 2006.

SEESURIYACHAN, P. et al. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 912-917, 2012.

SILVA, C. S. et al. Solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas isoladas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). **Revista Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2018.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003.

SILVA, J. M. et al. Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 8, p. 754-760, 2015.

SILVA JÚNIOR, J. M. T.; MENDES FILHO, P. F.; GOMES, V. F. F.; GUIMARAES, F. V. A.; SANTOS, E. M. Efeito da esterilização do substrato sobre o crescimento de mudas de meloeiro em presença de fungos micorrízicos arbusculares e composto orgânico. **Revista Caatinga**, v.25, p.98-103, 2012.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIM, V. **O papel de microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas**. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S., (Org) Fósforo na agricultura brasileira. Piracicaba, 2004, p. 117-149.

SOTTERO, A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 225-234, 2006.

SOUCHIE, E. L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Floresta**, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Ciências Biológicas Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo essencial para vida. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. (Org). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: ,2004, p. 726.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 491-502, 2003.

STURZ, A. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.

SUGAI, M. A. A.; COLLIER, L. S.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo de cerrado. **Bragantia**, v.70, n.2, p.416-423, 2011.

SUSLOW, T. V. **Role of root colonizing bacteria in plant growth**. 1. Ed London: Academic Press, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001.

TEIXEIRA, M. A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.

TRANI, P. A. et al. Couve de folha: do plantio à pós-colheita. **Boletim Técnico IAC**, Campinas, n. 214, p. 36, 2015

VENIERAKI, A. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 277-285, 2010.

VILELA, N. J.; LUENGO, R. F. A. Produção de hortaliças folhosas no Brasil. **Campo & Negócios Seção Hortifruti**. 2017. Disponível em:

<revistacampoenegocios.com.br/produção-de-hortalicas-folhosas-no-brasil/>. Acesso em: 06 de setembro de 2018.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**. v. 24, n. 1, p.305-311, 1992.

WALPOLA, B. C.; YOON, M-H. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 37, p. 6600-6605, 2012.

WRUCK, D. S. M.; OLIVEIRA, J. R.; DIAS, L. A. S. Especificidade de hospedeiro nas interações *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - brássicas. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.129-13, 2010.