

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

MARIA JOSÉ CAVALCANTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS
E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTAGÔNICO
A MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS
E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE HORTALIÇAS**

**Maceió
2013**

MARIA JOSÉ CAVALCANTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTAGÔNICO
A MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS
E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE HORTALIÇAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

Coorientador: Dr. Alessandro Riffel

**Maceió
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- S586c Silva, Maria José Cavalcante da.
Caracterização de rizobactérias e avaliação de seu potencial antagônico a microrganismos fitopatogênicos e na promoção de crescimento em mudas de hortaliças / Maria José Cavalcante da Silva. – 2013.
123 f. : il.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana.
Coorientador: Alessandro Riffel.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.
- Bibliografia: f. 89-123.
1. Rizobactérias. 2. Ácido indolacético. 3. Solubilização de fosfato.
4. Antibiose. 5. Plantas – Desenvolvimento. I. Título.

CDU: 543.9

A meus pais “*in memorian*”:

José Cavalcante da Silva

Geny Oliviera Cavalcante

A meus Filhos:

Fernando José Palmeira Oliveira

Fernanda Maria Palmeira Oliveira

A meu netinho amado:

Fernando Antônio Palmeira Oliveira

Soares

DEDICO

Durante o desenvolvimento do curso e conseqüentemente deste trabalho, encontrei pessoas com grande generosidade, que colaboraram nos estudos das disciplinas, nos experimentos de laboratório, de campo, nas análises dos dados, nas questões pessoais: profissionais e de família, dando-me apoio, amizade verdadeira, sem a qual esta investida seria impossível. Portanto, serei eternamente grata, por ter cruzado o caminho dessas pessoas.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Espírito Santo, iluminando o meu caminho e viabilizando o encontro com os “Anjos de Guarda”, possibilitando a execução desse trabalho e conseqüentemente fazendo-me suportar todas as adversidades durante o curso;

A Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado, todos os Docentes e funcionários do Instituto de Química;

Ao Professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana, pela orientação, paciência, credibilidade e liberdade de ação nos experimentos e na execução do meu trabalho de tese;

Ao Dr. Alessandro Riffel, pela coorientação e colaboração;

A Professora Dra. Tânia Marta Carvalho dos Santos, pela amizade, por ter cedido as misturas bacterianas, de onde foram isoladas as bactérias utilizadas nesse trabalho, como também, pela presteza na assistência das análises dos dados;

A Professora Dr^a. Lucia Maria Conserva, pela orientação inicial e por ter viabilizado a orientação pelo Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana;

A Secretaria do Estado de Educação do Estado, Secretaria de Educação do Município de Maceió e Secretaria de Educação do Município de São Miguel dos Campos, pela liberação para realização do curso;

Ao Laboratório Central do Estado de Alagoas, pela autorização da utilização dos Laboratórios de Microbiologia, para realização das análises de isolamento e de identificação dos isolados bacterianos. Em especial a Dr^a. Telma Machado Lisboa Machado, Rejane Barros Cavalcante, Paulo Costa Pereira, Dr^a. Roseane de Almeida Cunha Bastos, Kleber Fortes Junior, Alessandra Patricia Cavalcante, Meire Fonseca, Karine Alves e Michele Cabral;

Ao Professores: Dr. Eurico Lemos e Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, pela benevolência em todos os momentos que necessitei de suas colaborações;

Aos Professores Laurício Endres, pela colaboração e autorização do uso do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal; Rosa de Lima Mariano, pela presteza e bondade em ter cedido isolados bacterianos e autorização do uso do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco;

Aos Dr. Velber Xavier Nascimento; Dr. Sebastião Ferreira Palmeira Junior, Dr. Jaim Simões de Oliveira, Dr^a. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, Dr^a. Kátia Cilene Félix, pela amizade, colaboração nos experimentos de laboratório e nas análises dos dados;

A todos os colegas de curso, pela boa convivência. Em especial: a Andréa Marques Vanderley Ferreira, Jésu Ferreira, Anderson Marques de Oliveira, Jayran Souza Almeida, Vivian Karoline Tenório Souza, Dr^a. Maria Lysete Bastos e Fernando Maia, pela amizade, companheirismo, colaboração e os vários momentos de descontração compartilhados;

Aos alunos de iniciação científica: Jéssica, Maurício e Tamila, pela colaboração;

Ao Aldy dos Santos, pela acessibilidade, disposição e vários favores prestados, exemplo de um bom caráter e de um viver Cristão;

A Leocádia Augusta Soares Lima, pela amizade, companheirismo e colaboração;

As Colegas do Centro de Referência de Educação Ambiental da Secretaria de Educação do Município de Maceió: Yume Miranda Tosaka, Guendalina Lucas de Souza, Estécia Sarmento, Christiane Samya Lins Rodrigues, Maria Salete Maia, Luciana Tenório e, em especial a Rosilene Santana Barros, pela amizade, colaboração e tolerância na disponibilidade para a continuação desse trabalho;

Ao Edes Vitoretti, Maria José Francisco Vitoretti “Vó Maria” e Victor Vitoretti, Anjos de Guarda na vida do Nandinho.

Se soubesse que o mundo se desintegraria amanhã,
“Ainda assim plantaria a minha macieira”.

O que me assusta não é a violência de poucos, mas
a omissão de muitos!

Temos aprendido a voar como os pássaros, a nadar
como os peixes,

Mas não aprendemos a sensível arte de viver como
irmãos.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

Mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser,

Mas Graças a Deus,

Não sou o que era antes.

(Martin Luther King).

Quem pode contar a areia dos mares, as gotas da
chuva, os dias do tempo?

Quem pode atingir a altura do céu, a extensão da
terra, a profundidade do abismo?

“A sabedoria foi criada antes de todas as coisas...

“E a inteligência prudente vem da eternidade...”

(Eclesiástico 1: 2, 3, 4).

RESUMO

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas podem ser uma alternativa para o aumento da produtividade de hortaliças. Objetivou-se isolar, identificar e caracterizar rizobactérias por meio de testes bioquímicos e por análise do sequenciamento do gene RNAr 16S; investigar *in vitro*: antagonismo a fungos fitopatogênicos por meio de compostos voláteis; produção de ácido indol-acético (AIA); capacidade de solubilização de fosfato (CSP) e avaliar o desenvolvimento de mudas de couve, tomate e pimentão, bacterizadas, sob condições de casa de vegetação. Os isolados foram identificados por testes bioquímicos, pelo sistema automatizado vitek 2, como: *Alcaligenes faecalis* ssp *faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettigueri*, *Serratia marcescens* e *Myroides* sp, enquanto que, pelo sequenciamento do gene RNAr 16S, como: *A. faecalis*, *Myroides* sp, *P. putida*, *P. vulgaris*, *Providência* sp e *Serratia* sp. Todos os isolados produziram AIA, destacando-se com maiores concentrações *Providencia* sp e *Myroides* sp. Com relação ao antagonismo aos fungos *Pythium* sp, *Colletotrichum* sp *Colletotrichum musae*, *Cercosporidium* sp, *Curvularia* sp e *Sclerotium* sp. Todos os isolados inibiram o crescimento micelial, entretanto, *Serratia* sp foi o mais eficiente. Para solubilizar fosfato, *P. putida* e *Providencia* sp foram eficientes. No desenvolvimento de mudas de hortaliças, as médias da maioria das variáveis avaliadas para cada um dos tratamentos com os isolados, foram superiores à testemunha. Para o tomateiro, *Serratia* sp e a mistura dos isolados, apresentaram os melhores resultados. No entanto para couve, *Providencia* e a mistura dos isolados destacaram-se. Para o pimentão, houve incremento com todos os tratamentos. A mistura dos isolados promoveu os melhores resultados no desenvolvimento de mudas das hortaliças estudadas. As interações evidenciaram que uma espécie de rizobactéria que promove o crescimento em uma planta, pode não ser eficiente para outra espécie vegetal. As rizobactérias estudadas demonstraram que possuem potencial para serem empregadas no desenvolvimento de novos produtos para a promoção do crescimento de plantas e no controle de fungos fitopatogênicos por compostos voláteis.

Palavras-chaves: Rizobactéria. Ácido indolacético. Solubilização de fosfato. Antibiose.

ABSTRACT

The plant growth-promoting rhizobacteria may be an interesting way to promote increased vegetable production. Here, we aimed to isolate, identify, and characterize PGPRBs by using biochemical tests, sequencing of 16S ribosomal DNA, in vitro assessment of antagonism against pathogenic fungi, screening for indolacetic acid production, evaluating phosphate-solubilizing capacity, and evaluating the isolates on development assays in green house of cabbage, peppers and tomatoes seedlings. The isolated have been identified through system vitek 2, by biochemical tests as *Alcaligenes faecalis* sp *faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettigueri*, *Serratia marcescens* e *Myroides* sp; whereas by analysis of sequencing data for 16S ribosomal RNA the isolated bacteria have been identified as *A. faecalis*, *Myroides* sp, *P. putida*, *P. vulgaris*, *Providência* sp e *Serratia* sp. In the in vitro assessment of in the screening for indolacetic acid production under presence of tryptophan all isolated bacteria produced indolacetic acid highlighting with higher concentrations by *Providencia* sp and *Myroides* sp. In the antagonism against pathogenic fungi, *Pythium* sp, *Colletotrichum* sp, *Colletotrichum musae*, *Cercosporidium* sp, *Curvularia* sp and *Sclerotium* sp showed mycelial growth inhibition by volatile organic compounds produced. However, the best results were obtained with the isolated that has been identified as *Serratia* sp, *P. putida* and *Providencia* sp were efficient phosphate solubilization. In trials for the development of vegetable seedlings, the means of the majority of variables for each treatment with the isolates were higher than the control. For tomato, and *Serratia* sp and pool, the best results showed. For cabbage however, *Providencia* and Pool stood out. there was an increase in all treatments However for the chili. Pool treatment with results the best in the development promoted of seedlings of vegetables studied. The species of growth promoting rhizobacteria interactions demonstrate, that a in a plant, for another plant species may not be effective. The rhizobacteria studied here have shown the potential to be used in the development of new products for plant growth-promoting and control of phytopathogenic fungi.

Key words: Rhizobacteria. Indolacetic acid. Phosphate-solubilizing. Antibiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Descrição geral das diferentes vias de síntese dependente e independente de triptofano de AIA em bactérias.....	26
Figura 2 -	Padrão eletroforético da amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 500 pb do gene RNAr 16S em gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais EUBR1387R EUBF 933.....	52
Figura 3 -	Comparações par a par de sequências nucleotídicas do gene 16S RNAr entre os seis isolados de rizobactérias deste trabalho e outras bactérias disponíveis no GenBank.....	54
Figura 4 -	Árvore de Máxima Verossimilhança baseada na sequência parcial do gene RNAr 16S entre as rizobactérias.....	58
Figura 5 -	Padrão eletroforético da amplificação por PCR de fragmentos de aproximadamente 1500 pb do gene RNAr 16S através de gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais 27F e 1488.....	61
Figura 6 -	Padrão eletroforético da amplificação por PCR de fragmentos de aproximadamente 1500 pb do gene RNAr 16S através de gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais PO27F e 1387R	62
Figura 7 -	Dinâmica de crescimento e concentração de AIA dos 06 isolados	64
Figura 8 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de <i>Alcaligenes faecalis</i>	65
Figura 9 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado do isolado de <i>Myroides</i> sp.....	65
Figura 10 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de <i>Pseudomonas putida</i>	66
Figura 11 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de <i>Proteus vulgaris</i>	66
Figura 12 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de <i>Providencia</i> sp.....	67
Figura 13 -	Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de <i>Serratia</i> sp.....	67

Figura 14 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Pythium</i> sp, pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp (6).....	70
Figura 15 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Pythium</i> sp, pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	70
Figura 16 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (mandioca), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp.....	71
Figura 17 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (mandioca), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	71
Figura 18 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp <i>musae</i> (banana), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp (6).....	72
Figura 19 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum musae</i> (banana), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	72
Figura 20 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (tomate), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp.....	73
Figura 21 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (tomate), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	73

Figura 22 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (fava) pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp (6).....	74
Figura 23 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp (fava), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	74
Figura 24 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Cercosporidium</i> sp (uruçu) pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp.....	75
Figura 25 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Cercosporidium</i> sp (uruçu), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	75
Figura 26 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Curvularia</i> sp (cana-de-açúcar) pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp (6).....	76
Figura 27 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Curvularia</i> sp (cana-de-açúcar), pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	76
Figura 28 -	Inibição “ <i>in vitro</i> ” do crescimento micelial de <i>Sclerotium</i> sp (fava) pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> (1), <i>Myroides</i> sp (2), <i>Pseudomonas putida</i> (3), <i>Proteus vulgaris</i> (4), <i>Providencia</i> sp (5) e <i>Serratia</i> sp (6).....	77
Figura 29 -	Percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotium</i> sp (fava) pelos isolados de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Myroides</i> sp, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Providencia</i> sp e <i>Serratia</i> sp.....	77

Figura 30 -	Halos de solubilização de fosfato inorgânico (CaHPO ₄) ₂ por isolados de <i>P. putida</i> e <i>Providencia</i> sp em meio NYDA pH 7,0 a 28°C por sete dias.....	78
Figura 31 -	Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de tomate.....	79
Figura 32 -	Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de pimentão.....	80
Figura 33 -	Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de couve.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Produtos biológicos a base de BPCP comercializados no mundo	37
Tabela 2 -	Concentração final dos reagentes utilizados para reação de PCR/Região ITS 16S.....	44
Tabela 3 -	Identificação bioquímica automatizada dos isolados, realizada pelo Sistema VITEK® 2 Compact.....	50
Tabela 4 -	Bactérias depositadas no GenBank proximamente relacionadas aos isolados identificados.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Rizobactérias promotoras de crescimento	19
2.1.2	Marco histórico.....	19
2.1.3	Classificação das rizobactérias.....	20
2.1.4	Modos de ação utilizados pelas RPCPs.....	20
2.1.5	Interação entre plantas e RPCPs.....	21
2.1.6	Gêneros bacterianos que fazem parte do grupo das RPCP.....	22
2.1.7	Rizobactérias e a promoção do crescimento em plantas.....	23
2.1.8	Síntese de ácido indol acético (AIA).....	24
2.1.9	Solubilização de fosfato.....	31
2.1.10	Antibiose.....	33
2.1.11	Importância dos sistemas automáticos na identificação de RPCPs.....	38
2.1.12	Importância de técnicas moleculares no estudo da identificação e diversidade de RPCPs.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Obtenção e cultivo	41
3.2	Testes bioquímicos para identificação dos isolados	41
3.3	Ánálises das sequências do RNAr 16S	43
3.3.1	Extração de DNA genômico e identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S.....	43

3.3.2	Amplificação do RNAr 16S bacteriano.....	43
3.3.3	Sequenciamento do fragmento de RNAr 16S bacteriano.....	44
3.3.4	Análise filogenética.....	45
3.4.1	Determinação do ácido indolacético (AIA).....	45
3.5	Solubilização de fosfato.....	46
3.6	Antagonismo indireto a fungos fitopatogênicos (compostos voláteis).....	47
3.7	Avaliação do desenvolvimento mudas de couve, pimentão e tomate em casa de vegetação.....	48
3.8	Análise estatística.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Isolamento e obtenção dos isolados.....	50
4.2	Identificação das rizobactérias através do seqüenciamento do RNAr 16S.....	51
4.3	Determinação de AIA sintetizada via triptofano.....	62
4.4	Antibiose por compostos voláteis.....	68
4.5	Solubilização de fosfato.....	78
4.6	Promoção de crescimento em mudas bacterizadas de tomate, pimentão e couve.....	79
5	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

A comunidade microbiana do solo é responsável por atuar em todo o processo de decomposição da matéria orgânica do solo e, conseqüentemente, pode aumentar a sua fertilidade (COLEMAN; CROSSLEY; HENDRIX, 2004), por outro lado, as interações entre plantas e micro-organismos na rizosfera podem incrementar significativamente o crescimento e a saúde dessas plantas, nomeadamente através do aumento da eficiência da aquisição de nutrientes (RICHARDSON, 2009), destacando-se as rizobactérias, que são estimuladas pelos exsudatos radiculares, que vivem próximas ou associadas, colonizando o sistema radicular e promovendo o crescimento das plantas, tornando-as mais vigorosas, produtivas e saudáveis (VÁZQUEZ et al., 2000; OLIVEIRA, 2004; HAYAT et al., 2010).

Dentre os modos de ação responsáveis pela promoção de crescimento vegetal por bactérias, frequentemente estão envolvidos: a produção de ácido indolacético - AIA (SPAEPEN et al., 2009), por meio da enzima indolpiruvato descarboxilase, na presença do aminoácido triptofano (PRINSEN et al., 1993), onde o seu principal efeito é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (BARAZANI; FRIEDMAN, 1999); a solubilização de fósforo, devido algumas RPCP secretarem ácidos orgânicos e fosfatases, facilitando a conversão das formas insolúveis em solúveis, disponibilizando esse nutriente para as plantas (SOUCHIE et al., 2005), sendo de importância fundamental devido ser o segundo mineral limitante do crescimento vegetal (CHEN et al., 2006); como também a produção de antibióticos difusíveis (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008) e enzimas líticas como quitinases (KAVINO et al., 2010), propiciando um eficiente controle biológico de fitopatógenos na natureza (BAKKER et al., 2007).

Segundo Van Loon, Bakk e Pieterse (1998), quando uma RPCPs coloniza a raiz, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas agem com os sinalizadores de novas rotas metabólicas. Essas moléculas ativam genes promotores de compostos de defesa, levando à expressão da resistência sistêmica induzida (RSI). Os mecanismos de defesa relacionados à RSI mediados por RPCPs podem ser estruturais, como o aumento da lignificação da parede celular,

dificultando a entrada e colonização do patógeno ou bioquímicos pela presença de enzimas antioxidantes (ROMEIRO; GARCIA, 2003).

Em sistemas sustentáveis, uma das alternativas tecnológicas viáveis para aumentar a produção agrícola de diversas culturas de hortaliças é a rizobacterização de sementes, devido às rizobactérias apresentarem capacidade de adaptação metabólica e habilidade em produzir compostos, permitindo que possa se adequar ao competitivo ambiente rizosférico, promovendo efeitos no crescimento das plantas e no biocontrole de doenças radiculares e foliares, reduzindo custos de produção e diminuindo o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente, tornando-se necessário a identificação de espécies que possam aumentar significativamente a produtividade em todo o mundo (KAPULNIK, 2002; BENEDUZI; PASSAGLIA, 2011).

O conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção de novos micro-organismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

A taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana (CANHOS et al., 1997), tornando-se necessário sistemas automatizados para uma correta identificação dos isolados, como o sistema VITEK® 2 Compact (O'HARA, 2006) e a comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial na região RNAr 16S, considerada conservada entre as bactérias, mas, ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991).

Com base nesse contexto, este estudo teve o objetivo de isolar, identificar por meios bioquímicos e moleculares rizobactérias e avaliar antibioses difusíveis em relação às inibições de crescimentos de fungos fitopatogênicos; e os modos de ação: solubilização de fosfato e produção de ácido indol-acético "*in vitro*" além de avaliar o potencial das rizobactérias na promoção de crescimento de mudas de hortaliças: tomate, pimentão e couve, sob condição de casa de vegetação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rizobactérias promotoras de crescimento

2.1.2 Marco histórico

Inicialmente as pesquisas com rizobactérias não simbióticas começaram com o objetivo de ampliar o desenvolvimento e o proveito das plantas. Essas averiguações começaram em 1885 na Rússia e na Ucrânia, usando-se *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies do gênero *Bacillus*. Entretanto, somente após os trabalhos de Kloepper e Schroth (1978), com batata e rabanete, em que os autores evidenciaram a capacidade de beneficiar o crescimento e a bioproteção de plantas, é que foi formado o conceito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (LUZ, 1996).

O termo Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) ou (PGPR) "*Plant Growth Promotion Rhizobacteria*" foi adotado por Schroth e Hancock (1982), Zago, De-Polli e Rumjanek (2000), para descrever as bactérias benéficas que colonizam às raízes das plantas, além de serem eficientes competidoras com organismos deletérios na região da rizosfera.

Pesquisas sobre aplicações práticas de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) têm tido sucesso na medida em que já existem produtos comerciais à base dessas bactérias nos Estados Unidos, China, Austrália, País de Gales e Nova Zelândia (LUZ, 1996). Na China, são chamadas "yield-increasing bactéria" (YIB), sendo aplicadas extensivamente no campo, chegando a induzir aumentos médios de cerca de 21% em produtividade (FIGUEIREDO, M. V. B. et al., 2010).

Biofertilizantes são de baixo custo, são fontes renováveis de nutrientes para as plantas e podem atender a demandas da agricultura orgânica e familiar, pois reduzem o custo de produção, podendo ser utilizado tanto para o tratamento de sementes quanto em aplicação direta no solo (GOMES et al., 2011). O uso de inoculantes microbianos é considerado uma alternativa ambientalmente correta em relação às aplicações de fertilizantes químicos (KHAN et al., 2010) por contribuir com um sistema agrícola sustentável (AVIS et al., 2008).

Os primeiros trabalhos realizados no Brasil foram realizados por Freitas (1989) que avaliou *Pseudomonas fluorescentes* para aumentar o crescimento de plântulas de cafeeiro em condições de casa de vegetação. Desde então, vários estudos têm avaliado o efeito benéfico da utilização dessas bactérias (MARIANO et al., 2004). Atualmente, existem vários trabalhos com rizobactérias visando ao controle de doenças e à promoção do crescimento de plantas (JAGADEESH; KRISHNARAJ; KULKARNI, 2006; KUMAR et al., 2009).

2.1.3 Classificação das rizobactérias

As rizobactérias são classificadas de acordo com seus efeitos benéficos: i) bactérias biofertilizantes, que são aquelas fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato, utilizados pela planta, o que resulta em maior crescimento quando a quantidade de nitrogênio e fosfato do solo é limitada; ii) bactérias fitoestimuladoras, promotoras do crescimento da planta através da produção de hormônios; iii) agentes de biocontrole, capazes de proteger as plantas de micro-organismos fitopatogênicos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001) e também emiRPCPs, bactérias que residem dentro das células das plantas, produzindo nódulos, estruturas especializadas em fixação de nitrogênio em leguminosas e RPCPs, bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, que não produzem nódulos, mas promovem o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas (GRAY; SMITH, 2005).

2.1.4 Modos de ação utilizados pelas RPCPs

Os benefícios obtidos pela inoculação destas bactérias podem ser variados, e são descritos como mecanismos diretos e indiretos.

Mecanismos diretos:

Produção do ácido-indol-acético, giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos (MARIANO et al., 2004; GONZALEZ-LOPEZ, 2005; ARKHIPOVA et al., 2005; ARAUJO; HENNING; HUNGRIA, 2005), fixação assimbiótica de nitrogênio (CARDOSO et al., 2011), solubilização de fosfato mineral (SOUCHIE et al., 2005) entre outros.

Mecanismos indiretos:

Quando as rizobactérias atuam como agentes de controle biológico através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe^{+3} , parasitismo, indução de resistência, proteção cruzada (MARIANO et al., 2004; BYRNE et al., 2005; CARDOSO et al., 2011), síntese de compostos orgânicos que captam ferro (sideróforos) (LACAVA et al., 2008).

2.1.5 Interação entre plantas e RPCPs

As interações solo-microrganismos-rizosfera-plantas são constantes, agronomicamente e ecologicamente relevantes por estarem associadas com os determinantes de saúde da planta e fertilidade do solo (OSÓRIO, 2007; HAYAT et al., 2010), tais como os ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e outros ciclos biogeoquímicos e de nutrientes, pois interagem diretamente com as raízes das plantas (MATSUMOTO et al., 2005; TORRES; LIZARAZO, 2006).

A utilização das rizobactérias em associação, aplicadas em co-inoculação de sementes ou mudas transplantadas, podem potencializar a atuação de determinados isolados bacterianos que apresentam efeito sinérgico entre si (SILVA et al., 2006).

Os efeitos destes micro-organismos sobre o desenvolvimento das plantas têm sido amplamente estudados em várias culturas e caracterizados pelo aumento no índice de germinação das sementes e emergência de plântulas, aceleração do crescimento e uniformização das mudas, maior produção, produtividade e antecipação da colheita (RAMM et al., 2012). Fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas: incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita, no aumento de peso de matéria seca da raiz (HOWEL; STIPANOVIC, 1980; WHIPPS, 1997; BOWEN; ROVIRA, 1999; MARIANO et al., 2004)

RPGs também têm sido relatadas em processos de biorremediação de solo, degradando e mesmo mineralizando compostos orgânicos recalcitrantes em associação com plantas (ZHUANG et al., 2007).

2.1.6 Gêneros bacterianos que fazem parte do grupo das RPCPs

Bactérias pertencentes a diversos gêneros são consideradas RPCPs: *Agrobacterium radiobacter* (BEIJERINCK; VAN DELDEN, 1902; CONN, 1942), *Azotobacter*, (KLOEPPER, 1983), *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (KLOEPPER, 1983; KLOEPPER et al., 1991; OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994; GLICK, 1995; SPAEPEN et al., 2009), *Burkholderia* (GLICK, 1995), *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* (BEIJERINCK, 1898), *Herbaspirillum* (SPAEPEN et al., 2009), *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia* (BURKHOLDER, 1950; MARIANO et al., 2004), *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001); *Streptomyces* (WAKSMAN; HENRICI, 1943), *Serratia* (KLOEPPER, 1983; SPAEPEN et al., 2009), *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Arthrobacter* (SPAEPEN et al., 2009), *Paenibacillus* e *Bacillus* sp (COHN, 1872; SPAEPEN et al., 2009). Este último apresentando maior período de viabilidade, devido à capacidade de produção de endósporos (PINTO et al., 2011).

Pseudomonas (MIGULA, 1894; KLOEPPER, 1983; KLOEPPER et al., 1991; OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994; GLICK, 1995; SPAEPEN et al., 2009) é o gênero mais estudado dentro do grupo de rizobactérias capaz de promover o crescimento vegetal (FERREIRA et al., 2009), que possuem versatilidade nutricional e habilidade de crescer em ampla variedade de ambientes e substratos, tornando-o forte competidor na rizosfera. Também, recebem especial atenção no meio científico pela facilidade de cultivo *in vitro* e de manipulação genética (HAAS; KEEL, 2003). Sua atuação é relevante devido a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (HAAHTELA et al., 1983), de produzir fitohormônios (HUSSAIN; VANCURD, 1970), de produzir poliaminas (GORIS; KERSTER; DE VOS et al., 1998), solubilização de fosfatos (BABALOLA, 2010). Atuando também como agente no controle biológico de varias pragas e doenças (MISKO; GERMIDA, 2002); alguns representantes do gênero estimulam a nodulação de leguminosas por *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. (POLONENKO et al., 1987) e, ainda que isso não esteja diretamente ligado a sua atividade de promoção de crescimento, já foi relatado como eficiente na degradação de poluentes (YEE; MAYNARD; WOOD, 1998).

2.1.7 Rizobactérias e a promoção do crescimento em plantas

Os benefícios das RPCPs podem ser observados nas mais variadas espécies vegetais e confirma a promoção de crescimento, aumento no volume de raízes, maior absorção de água e nutrientes em hortaliças e plantas cultivadas: abóbora e alface, (FREITAS; DE MELO; DONZELI, 2003; DIAS, A. et al., 2009), alface (OLSEN; MISAGHI, 1981), amendoim (KISHORE; PANDE; PODILE, 2005), arroz (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009), batata (KLOEPPER; SCHROTH; MILLER, 1980), berinjela (KUMAR, 1998), beterraba (THRANE et al., 2000), cebola (HARTHMAN, 2010), couve (DIAS, A. et al., 2009; PINTON et al., 2010), ervilha (KLOEPPER; SCHORTH, 1981), feijão (SILVEIRA et al., 1995), grão-de-bico (KUMAR, 1998; JOSEPH; RANJAN PATRA; LAWRENCE, 2007), melancia (SANTOS et al., 2008), canola do híbrido Hyola 433 (RAMM et al., 2012), melão (SILVA et al., 2010), milho (PAN et al., 1999), pepino (LUCON; AKAMATSU; HARAKAVA, 2008), rabanete (KLOEPPER; SCHORTH, 1981), rúcula (DIAS, A. et al., 2009), Salsa (DIAS, A. et al., 2009), soja (ARAUJO; HUNGRIA, 1999), sorgo (CHIARINI et al., 1997), tomate (DE ARAÚJO; DE CARVALHO, 2009).

Também foram utilizadas em várias outras plantas de importância econômica como plantas ornamentais (YUEN; SCHROTH, 1986), café (FREITAS, 1989), citros (FREITAS; VILDOSO, 2004), *Camellia sinensis* (L.) (SARAVANAKUMAR et al., 2007), árvores florestais (GARCIA et al., 2004); em espécies arbóreas de interesse comercial, Teixeira et al. (2007) obtiveram um aumento substancial no enraizamento de estacas de eucalipto, após a inoculação de estirpes de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Já em *Pinus*, a inoculação da actinobactéria A43 aumentou a produção de massa seca da parte aérea e raízes (VASCONCELLOS; CARDOSO, 2009). Representando uma alternativa para a agricultura no aproveitamento mais eficaz de fertilizantes e como rizo-remediadoras, pela degradação de compostos nocivos às plantas (BAKKER et al., 2007) e por elevar a produção sem o uso desenfreado de agrotóxicos e adubos químicos (SOKOLOVA; AKIMOVA; VAISHLYA, 2011), permitindo uma redução na aplicação de fertilizantes de até 50%, sem haver reduções na produtividade (ALVES; DODDEY; URGUAGA, 2003; ADESEMOYE; TORBERT; KLOEPPER, 2009; HAYAT et al., 2010; MIRANSARI, 2011).

2.1.8 Síntese de ácido indol acético (AIA)

Nos modos de ação propostos para os efeitos benéficos causados por RPCPs incluem a síntese de fitormônios de plantas como ácido 3-indol acético (AIA) que regula o crescimento em plantas (LAMBRECHT et al., 2000).

Fitormônios são substâncias químicas que em baixas concentrações promovem o crescimento das plantas, influenciando no seu crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular de tecidos (SPAEPEN et al., 2009). Por causa da capacidade de estimular ou inibir o crescimento de planta, estes também são chamados de reguladores de crescimento de plantas. Cinco principais grupos de fitormônios são reconhecidos: auxinas, giberelinas, etileno, citocininas e ácido abscísico (SAHARAN; NEHRA, 2011).

As auxinas são os fitormônios mais importantes das plantas e são produzidas principalmente na gema apical do caule e transportadas através das células do parênquima até as raízes (BARAZANI; FRIEDMAN, 1999).

Em 1880, Charles Darwin propôs que algum crescimento da planta é regulado por 'um fator que transmite seu efeito de uma parte da planta para outra' (DARWIN; DARWIN, 1880). Décadas depois, este fator nomeado auxina (do Grego '*auxein*' que significa 'crescer') foi identificado como ácido indol-3-acético (WENT; THIMANN, 1937).

O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal forma natural da auxina. Este fitormônio funciona como uma chave reguladora para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas, incluído divisão e alongação, diferenciação, tropismo, dominância apical, senescência, abscisão e floração (WOODWARD; BARTEL, 2005; TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). Este efeito no desenvolvimento da planta é dependente da concentração do hormônio auxina. Concentrações muito altas de auxina inibem a alongação celular e, portanto, o crescimento de órgãos. Adicionalmente, a sensibilidade das células a auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível a auxina que a raiz (TAIZ; ZAIGER, 2004).

Nas raízes, os fenótipos associados à auxina melhor caracterizados são o aumento dose-dependente do tamanho dos pelos epidérmicos das raízes secundárias, o efeito bimodal da concentração de auxina sobre o tamanho da raiz primária, e o aumento dose-dependente no número de primórdios radiculares laterais e resposta a gravidade (PITTS; CERNAC; ESTELLE, 1998; RAHMAN et al., 2002; ISHIDA et al., 2008; PERET et al., 2009).

A biossíntese de auxina nas plantas é bastante complexa. Duas principais vias de biossíntese de AIA tem sido proposta para plantas (Figura 1): uma via dependente de triptofano (Trp) na qual do ácido 3-indol acetico (AIA) e biossintetizado a partir do aminoácido triptofano e outra triptofano independente (WOODWARD; BARTEL, 2005; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; CHANDLER, 2009; NORMANLY, 2010). Na biossíntese de AIA Trp-independente, glicerol-3-indol fosfato ou indol é provavelmente o precursor, porém pouco é conhecido sobre a via bioquímica (OUYANG; SHAO; LI, 2000; ZHANG et al., 2008). Na biossíntese de AIA Trp-dependente, várias vias têm sido propostas: (i) via do Indol-3-Acetamida (IAM); (ii) via do Ácido Indol-3-Pirúvico (IPA); (iii) via da Triptamina (TAM) e (4) via do Indol 3-Acetaldoxime (IAOX) (WOODWARD; BARTEL, 2005; POLLMANN; MULLER; WEILER, 2006; CHANDLER, 2009; MANO et al., 2010; NORMANLY, 2010; ZHAO, 2010).

Não apenas as plantas, mas também outros organismos incluindo fungos e bactérias são capazes de sintetizar AIA (ARSHAD; FRNAKENBERG, 1991). Várias vias de biossíntese de AIA têm sido identificadas em bactérias, e estas apresentam um alto grau de similaridade com aquelas observadas nas plantas (SPAEPEN, VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de sintetizar AIA (PATTEN; GLICK; 1996; KHALID et al., 2004). Estudos relatam evidências para existência de mais de uma rota para síntese de AIA em uma única bactéria, as quais podem selecionar uma rota particular, dependendo das condições do ambiente (PATTEN; GLICK, 1996; DOBBELAERE et al., 1999).

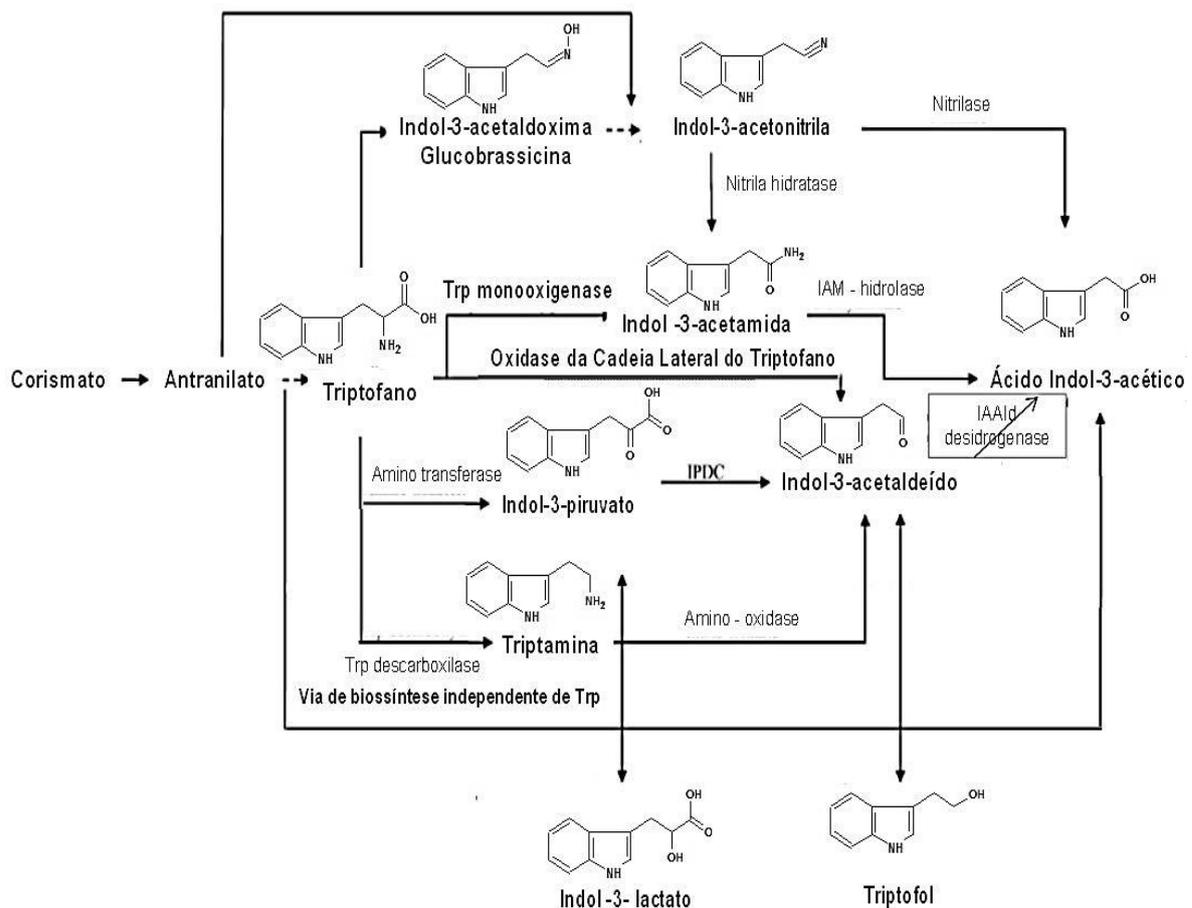
Cinco diferentes vias utilizando o triptofano como precursor de AIA foram identificadas em bactérias: (i) via IAM, (ii) via IPA, (iii) TAM, (iv) via da Indol-3-

Acetonitrila (IAN) e (v) via da Oxidase da Cadeia Lateral do Triptofano (TSO) (Figura 1) (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

A via da Indol-3-Acetamida (IAM), é a via melhor caracterizada e está presente em vários patógenos e pode contribuir para virulência desses isolados por produzir grande quantidade de AIA (CARTIEAUX et al., 2003; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

A via IAM consiste de dois passos distintos. Inicialmente a triptofano monooxigenase (codificada pelo gene *iaaM*) converte triptofano a Indol-3-Acetamida (IAM).

Figura 1 – Descrição geral das diferentes vias de síntese dependente e independente de triptofano de AIA em bactérias.



Fonte: Adaptado de: Spaepen, Vanderleyden e Remans (2007).

Nota: IAAId, Indol-3-acetaldeído; IAM, Indol-3-acetamida; IPDC, Indol-3-piruvato descarboxilase; Trp, Triptofano.

No segundo passo IAM é hidrolisado a AIA e amônia, por uma IAM hidrolase (codificada pelo gene *iaaH*). Ambos os genes foram caracterizados em muitos fitopatógenos assim como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, mas também em bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio como, por exemplo, espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (SEKINE; WATANABE; SYONO, 1989; CLARK et al., 1993; MORRIS, 1995; THEUNIS et al., 2004).

A via do Indol-3-piruvato (IPA) é a principal via de síntese de auxina em plantas. A via IPA foi demonstrada em muitas bactérias assim como no fitopatógeno (*P. agglomerans*), bactérias benéficas para as plantas (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*) e mesmo cianobactérias (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Esta via ocorre em três passos: No primeiro passo o triptofano é convertido em Indol-3-piruvato (IPA) por uma aminotransferase; em seguida, o IPA é descarboxilado a indol-3-acetaldeído (IAAld), o qual é então oxidado a AIA por uma desidrogenase. O passo de descarboxilação é catalisado por uma enzima chave, a indol-3-piruvato descarboxilase, que é codificada pelo gene *ipdC*. A inativação desse gene resulta no impedimento na produção de AIA, indicando a importância das enzimas codificadas e conseqüentemente a via IPA na biossíntese de AIA (PRINSEN et al., 1993; COSTACURTA.; KEIJERS.; VANDERLEYDEN, 1994).

Na via da triptamina (TAM), o triptofano é inicialmente descarboxilado a triptamina pela enzima triptamina descarboxilase e a triptamina diretamente convertida a IAAld por uma amina oxidase. Esta via foi identificada em *Bacillus cereus* pela identificação da atividade descarboxilase (PERLEY; STOWE, 1966) e em *Azospirillum*, a suplementação exógena de triptamina é convertida a AIA (HARTMANN; SINGH; KLINGMÜLLER et al., 1983).

A via do Indol-3-Acetonitrila (IAN) tem sido sugerida e estudada por muitos anos em plantas, porém o exato papel ainda permanece em debate. Em bactérias, nitrilases com especificidade por IAN foram detectadas (HOWDEN et al., 2009). Na bactéria *Alcaligenes faecalis* e *A. tumefaciens*, foram identificadas atividades nitrilases e amidase indicando a conversão de IAN a AIA (KOBAYASHI et al., 1995).

A via da Oxidase da Cadeia Lateral do Triptofano (TSO) foi encontrada apenas em *Pseudomonas fluorescens* CHA0, e nesta o triptofano é diretamente convertido a IAA ignorando a via IPA (OBERHÄNSLI; DE´FAGO; HAAS, 1991).

Estudos utilizando mutantes knock-out de *Arabidopsis thaliana* para biossíntese de triptofano mostraram que plantas são capazes de sintetizar AIA sem o triptofano como precursor e o ponto de ramificação para esta via surge no indol-3-glicerol fosfato ou indol (WOODWARD; BARTEL, 2005).

Esta via é predominante no caso de suplementação de triptofano ao meio: 90% da AIA é sintetizado via triptofano independente, enquanto 0,1% é produzido pela via IAM (PRINSEN et al., 1993)

Esta via foi sugerida na bactéria *A. brasilense*, no entanto, como nenhuma enzima ou gene foram identificados, não existe evidências que suportam essa via (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

Em plantas a maioria das AIA são encontradas em uma forma conjugada a açúcares ou aminoácidos, denominadas AIA-conjugados; apenas uma pequena quantidade de AIA livre está presente. AIA-conjugados estão envolvidos no transporte, armazenamento e proteção da degradação enzimática das AIAs. Em bactérias a presença de AIA-conjugados foi demonstrada apenas para a bactéria *P. savastanoi pv. savastanoi*. Acredita-se que AIA-conjugados são produzidas por *P. savastanoi* para proteger AIA contra degradação por enzimas das plantas e são hidrolisados no interior da planta para ativar AIA, promovendo a formação de galhas (GLASS; KOSUGE, 1988).

Interações entre bactérias que produzem AIA e plantas levam a resultados diferentes no que diz respeito à planta, variando da patogênese a fito-estimulação. Bactérias utilizam AIA para interagir com as plantas como parte de sua estratégia de colonização, incluindo fitoestimulação e evasão dos mecanismos de defesa basal da planta.

O efeito de auxinas em plântulas é dependente da concentração. Mudanças de plantas distintas respondem diferencialmente a concentrações variáveis de auxinas

(SARWAR; FRANKENBERGER, 1994) e tipos de micro-organismos (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2005).

Isolados bacterianos que produzem AIA tem efeitos estimulatórios no crescimento de plantas. Na cultura do trigo, isolados bacterianos que produzem altas quantidades de auxinas, por exemplo, AIA e IAM em solos não esterilizados, causam o aumento máximo no crescimento e desenvolvimento da cultura (KHALID et al., 2004). Mesmo os isolados que produzem baixas quantidades de AIA, sua liberação contínua promove o crescimento da planta (TSAVKELOVA et al., 2007).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, especialmente *P. fluorescens* e *P. putida* são umas das mais importantes promotoras de crescimento as quais produzem auxinas e promovem o desenvolvimento de plantas (SAHARAN; NEHRA, 2011). Patten e Glick (2002) verificaram que *Pseudomonas putida* aumentou de 35% a 50% o crescimento primário das raízes de canola (*Brassica campestris*), devido a produção de AIA. Eles demonstraram diretamente que o fito-regulador bacteriano tem um papel importante na elongação da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta hospedeira. Efeito semelhante foi obtido por Cattelan, Hartel e Fuhrmann (1999), com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. em soja.

Muitos estudos indicam as bactérias do gênero *Pseudomonas* frequentemente são predominantes na rizosfera, onde têm papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na fertilidade do solo (ROSALES et al., 1995; PICARD et al., 2000). Os resultados provenientes da inoculação desses micro-organismos podem ser grandemente influenciados pelo conteúdo de nutrientes e tipo de solo (PAULA et al., 1992; EGAMBERDIYEVA; HÖFLICH, 2003; ÇAKMAKÇI, et al., 2006). Adicionalmente, foi observado que os melhores resultados para inoculação de *Pseudomonas* sp ocorreram para solos com baixos teores de nutrientes. Neste tipo de solo a deficiência de nutrientes do solo teria sido compensada pela produção de substâncias reguladoras na interface-solo raiz, o que, por sua vez, teria estimulado um melhor desenvolvimento das raízes, resultando numa melhor absorção de água e nutrientes do solo (EGAMBERDIYEVA, 2007).

Estudos de inoculação de batata-doce com rizobactérias produtoras de AIA revelaram um significativo aumento no crescimento por permitir uma maior absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e manganês pela planta (FARZANA; RADIZAH, 2005). Espécies de *Rhizobium* são utilizadas como um bioestimulante e biofertilizante para produção de trigo por causa da sua capacidade de produzir AIA e subsequentemente aumentar o sistema radicular das plantas, permitindo uma maior absorção de N, P e K (ETESAMI et al., 2009).

Rizobactérias do gênero *Serratia* sp têm sido incluídas entre as produtoras de fitormônios (SRINIVASAN; PETERSEN; HOLL, 1996; BUCHENAUER, 1998). Selvakumar et al. (2007), avaliaram o potencial do isolado SEM (MTCC 8708) de *Serratia marcescens* quanto a tolerância ao frio e promoção de crescimento de trigo. Foi observado isolado SEM (MTCC) aumentou significativamente a biomassa e absorção de nutrientes em mudas de trigo na temperatura de 4°C e um acréscimo na absorção de nutrientes pelas plantas. Este fenômeno foi atribuído à capacidade do isolado produzir AIA e solubilizar fosfato, que influenciou positivamente o crescimento e desenvolvimento das raízes.

Isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Providencia* foram avaliados como inoculantes em plantas de feijão mungo (*Vignaradiata*). As três rizobactérias foram capazes de aumentar a biomassa, o tamanho e número de raízes e este resultados foram atribuídos à habilidade dos isolados produzirem AIA, solubilizar fosfato e apresentar atividade desaminase simultaneamente (AKHTAR; ALI, 2011).

Bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, a capacidade de mineralização de nutrientes e produção de sideróforos ou solubilização de fósforo e produção de auxinas, são desejáveis para uma possível aplicação no campo, proporcionando o aumento da produção agrícola (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

Além dos efeitos no tamanho e desenvolvimento das plantas a auxina de origem bacteriana desempenha um importante papel na germinação de sementes. *Azospirillum brasilense* Az39 e *Bradyrhizobium japonicum* E109, são capazes de excretar AIA em meio de cultura, numa concentração suficiente para produzir

mudanças morfológicas e fisiológicas em tecidos jovens de sementes de milho (*Zea mays* L.) (CASSA'NA et al., 2009).

A produção do hormônio, a síntese de auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA) promove o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, melhorar o crescimento da planta (CABALLERO-MELLADO, 2006).

Neste contexto, a produção de reguladores de crescimento vegetal (ou fitormônios) tem um papel importante, pois estes podem favorecer o crescimento ou alterar mecanismos fisiológicos da planta hospedeira, beneficiando a colonização desta por alguns micro-organismos em detrimento de outros.

2.1.9 Solubilização de fosfato

Depois do nitrogênio, o fósforo (P) é o segundo mineral limitante do crescimento vegetal. No solo, há grandes reservas deste elemento nas formas insolúveis, pois é altamente reativo com elementos como alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca), tornando-o indisponível para as plantas, portanto muitos tipos de solos são deficientes em fósforo livre (a forma disponível para as plantas), e mesmo em solos férteis é encontrado em baixíssimas concentrações (0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de H₂PO₄⁻). As reservas de fosforo encontradas no solo são, em parte, rochas e outros depósitos minerais (Pi), sendo que 30% a 50% do P total do solo é de origem orgânica (REIS et al., 2008).

As plantas são constituídas de cerca de 0,2% do seu peso seco, onde são encontrados diferentes compostos orgânicos, tais como fosfo-lipídios, fosfo-açúcares, fosfatos de inositol, ácidos nucleicos e ATP, sendo o fosforo um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas tais como inúmeras etapas das vias C3 e C4 do ciclo de Calvin e da glicólise, que vêm para o chão pela adição de esterco de animais e lixo (BARBER, 1995).

A maior parte dos componentes orgânicos do P no solo são os fitatos que consistem principalmente de inositol hexa-e penta-fosfatos. A enzima fitase é uma

das fosfatases responsáveis pela desfosforilação de fitato e, por conseguinte, desempenha um papel fundamental na nutrição de plantas (UNNO et al., 2005).

Um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido utilizados para a produção de fitase como *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Enterobacter sporotrichum*, *Rhizomucor*, *Azospirillum*, entre outros (RICHARDSON; HADOBAS, 1997; KEROVUO et al., 1998; IDRISSE et al., 2002; JAVED et al., 2010.).

De acordo com Venieraki et al. (2011), as bactérias solubilizadoras de fosfatos dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos no meio em que o micro-organismo se desenvolve cuja ação tem sido atribuída às suas propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} . O ácido mais freqüentemente observado entre os solubilizadores de fosfatos é o ácido glucônico, mas foram observados também ácidos cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico e succínico em diferentes espécies de RPCP (KUCEY; JANZEN; LEGGET, 1989; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; KHAN et al., 2009).

As populações bacterianas solubilizadoras de P são consideravelmente altas em solos rizosféricos, incluindo bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, entre outras (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; RODRIGUEZ et al., 2006).

O fósforo apresenta efeitos diretos e indiretos sobre a vegetação. Seu aumento tem efeito positivo na quantidade e qualidade das produções agrícolas (efeitos diretos). Através dos efeitos das interações indiretas, o fósforo aumenta as respostas do nitrogênio e do potássio nas produções agrícolas e tem efeitos positivos na fixação de nitrogênio, na manutenção da matéria orgânica, na capacidade de retenção de umidade, no controle da erosão e em outras propriedades físicas e químicas do solo. Todos esses efeitos positivos resultam em aumento da produção agrícola, produtividade contínua e conservação do solo (BANNANTE, 1998).

A insustentabilidade do sistema atual de produção de alimentos ocorre devido ao uso abusivo de fertilizantes químicos onde a maioria dos solos agrícolas contém grandes reservas de fósforo acumulado, como consequência de aplicações regulares de fertilizantes. Contudo, uma grande porção é rapidamente imobilizada após a aplicação, pois dependendo do pH e tipo de solo, torna-se indisponível as plantas (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Pode ser que apenas 10% do fosfato adicionado sejam realmente utilizados pelas plantas, enquanto os outros 90% escorrem para o ambiente ou ficam retidos no solo em formas não-assimiláveis (ADESEMOYE; KLOEPPER, 2009 b).

Atualmente, cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados utilizados são importados, o que compromete a sustentabilidade da agricultura (BRASIL, 2009). Ainda que uma bactéria solubilizadora de fosfato não substitua completamente a aplicação do fertilizante, uma vez que cultivos sucessivos sem adição de P externo irão esgotar o solo, como aconteceu na Europa no século XIX (DAWSON; HILTON, 2011). Esta pode aumentar drasticamente a eficiência do fertilizante que for adicionado à lavoura sendo possível adicionar quantidades menores de fosfato enquanto a planta aumenta a biomassa, comparado a um controle não-inoculado e completamente fertilizado (PANHWAR et al., 2011).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos, aliados ou não a outros micro-organismos benéficos do solo, podem aumentar a taxa de crescimento das plantas (CHABOT; ANTOUN; CESCAS, 1993; KIM; JORDAN; McDONALD, 1998; SINGH; KAPOOR, 1999), por apresentarem a capacidade de solubilização de fosfatos existentes no solo ou adicionados na forma de fertilizantes (WHITELOW, 2000; RICHARDSON, 2009) ou pela liberação de hormônios, solubilização de outros nutrientes, como K, além de apresentarem efeito comprovado na interação com micorrizas, fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento vegetal (MEDINA et al., 2006; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007; RICHARDSON, 2009; VASSILEVA et al., 2010).

2.1.10 Antibiose

Dentre os diversos mecanismos específicos que as rizobactérias utilizam para promover a supressão de patógenos se inclui a antibiose (WEI; KLOEPPER;

TUZUN, 1991; KOKALIS-BURELLE; KLOEPPER; REDDY, 2006; BOTELHO et al., 2006; MANSOOR; SULTANA; EHTESHAMUL-HAQUE, 2007), uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito nocivo sobre o outro (BETTIOL, 1991), inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001).

Microrganismos antagonísticos têm sido avaliados como um meio de controlar podridões radiculares causadas por *Fusarium* sp em cravo (MICHAEL; NELSON, 1972), trigo (STEVENSON, 1956), soja (CUBETA; HARTMAN.; SINCLAIR, 1985), cebola (UTKHEDE; RAHE, 1983). Destacando-se, devido ser uma alternativa para prevenção e controle de doenças e pragas na agricultura (SOUZA, 2001; MARIANO et al., 2004), que operam em ação conjunta ou isoladamente (CORRÊA; BETTIOL; MORANDI, 2009).

Os gêneros bacterianos que mais se ressaltam são: *Pseudomonas putida* e *fluorescens* (CAMPOS SILVA et al., 2008), *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Arthrobacter* (SPAEPEN et al., 2009), *Streptomyces* (CAMPOS SILVA et al., 2008; FARIAS et al., 2009), *Frankia*, *Bradyrhizobium* (PEREIRA et al., 2008), *Azotobacter* (SANTOS, 2009), *Agrobacterium*, *Rhizobium* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999) e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008).

Os testes de antagonismo *in vitro* têm a capacidade de detectar a ação antibiótica, utilizados por agentes de controle biológico sobre fitopatógenos. Essa técnica, normalmente é realizada sobre placas com Agar, mensurando-se o halo de inibição entre as colônias, que varia de acordo com a eficiência do metabólito produzido pelo agente de controle biológico (MARIANO, 1993).

Antibióticos antifúngicos têm função de controlar biologicamente patógenos de plantas (POTERA, 1994) e fungos pós-colheita (KLISH et al., 1993). Várias dessas substâncias antifúngicas têm sido caracterizadas e muitas são polipeptídeos compostos em sua maioria por aminoácidos e alguns outros resíduos. Como exemplo tem-se a fungicina M-4 produzida pelo *Bacillus licheniformis*, a qual é composta por 34 resíduos de aminoácidos de sete tipos (LEBBADI et al., 1994) e a

Rhizoctina A, produzida pelo *Bacillus subtilis* ATCC6633 que é um fosfono-oligopeptídeo (KLUGER, 1991).

Também podem ser citados antibióticos como fenazinas, fluoroglucinol, pirrolnitrina, pioluteorina (WELLER; THOMASHOW; 1993), fungicidas, nematicidas (SOUSA, 2006) e cianeto de hidrogênio (HCN), sendo a produção destes compostos regulados por meio de um “quorum-sensing”. Este mecanismo no qual as bactérias se comunicam através de sinalizadores que são pequenas moléculas difusíveis, sendo em Gram-negativas moléculas do tipo N-acilhomoserina lactonas (AHLs) (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003; BOTELHO et al., 2006).

Segundo Brunetta et al. (2007) a eficácia no controle de patógenos através dos antibióticos depende da suscetibilidade da população do patógeno-alvo. Assim, a introdução de diferentes isolados de rizobactérias que produzem antibióticos e que diferem no modo de ação, pode resultar num controle mais eficaz e reduzir a inconsistência do controle.

O antagonismo exercido pelas bactérias sobre os fungos pode ser através de competição por nutrientes, espaço, produção de sideróforos, antibiose, produção de enzimas hidrolíticas (GERHARDSON, 2002). Também pode atuar por meio de outros mecanismos de antagonismo, como produção de compostos voláteis inibitórios. Estes compostos apresentam baixa massa molecular, podendo pertencer a classes químicas dos alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, compostos de enxofres e terpenos (WHEATLEY, 2002). Os compostos voláteis podem reduzir ou até mesmo inibir a germinação de esporos de diversos fungos (CHUANKUN et al., 2004).

Muitos fitopatógenos como *Aphanomyces* spp, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp, *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Thielaviopsis basicola* e *Verticillium* spp, são negativamente afetados por RPCPs por meio da produção de metabólitos bacterianos, tais como antibióticos, cianeto de hidrogênio (HCN), quelantes de ferro (sideróforos) e degradação da parede celular por enzimas (KLOEPPER et al., 1999).

Em trabalho realizado por Wheatley (2002) sobre interações mediadas por voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo, demonstrou-se que dependendo do isolado bacteriano, o crescimento micelial dos isolados fúngicos era estimulado em até 40% ou inibido em até 60%.

De acordo Bettiol e Morandi (2009), no Brasil, diversos produtos biológicos estão disponíveis para utilização, dentre esses podem se citados: estirpes fracas de Citrus tristeza vírus (CTV) para premunização contra tristeza dos citros; estirpes fracas de Papaya ringspot virus-watermelon strain (PRSV-W), para premunização contra o mosaicoda abobrinha; *Hansfordia pulvinata* para o controle do mal-das-folhas da seringueira; *Acremonium* sp para o controle da lixa do coqueiro; *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento; *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças; *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea.

Segundo Mariano et al. (2004), já existem diversos produtos biológicos a base de BPCP sendo comercializados no mundo (Tabela1), embora no Brasil ainda não exista registro para nenhum dos relacionados.

O produto comercial serenade® da Agraquest encontra-se em fase de registro para sua comercialização no Brasil (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Dados recentes revelam que *B. subtilis* é capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010), no entanto, muitas dessas substâncias voláteis produzidas por este micro-organismo são ainda desconhecidas (KAI et al., 2007).

Chen et al. (2008), encontraram 14 compostos voláteis de *B. subtilis*, identificados através da cromatografia gasosa de espectro de massa (CG-MS), com aparente fonte de compostos bioativos.

A natureza antifúngica de alguns dos compostos, tais como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol, 4-hidroxibenzaldeído e 2-nonanona, foi também demonstrada em outros patossistemas (WANG et al., 2004, ALMENAR et al., 2007).

Tabela 1 – Produtos biológicos a base de BPCP comercializados no mundo.

Produto	Organismo	Organismo-Alvo	Fabricante
Actinovate	<i>Streptomyces lydicus</i>	Doenças causadas por patógenos habitantes do solo	NaturalInd.,Inc. (USA)
BioJect	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Colletotrichum</i> sp, <i>Pythium aphanidermatum</i>	EcoSoil Systems, Inc (USA)
Spot-Less			
Bio-Save 10LP			
Bio-Save 110	<i>P. syringae</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor pyriformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	EcoScienceCorp. (USA)
BlightBan A506	<i>P. fluorescens</i> , A506	<i>Erwinia amylovora</i> e bactérias nucleadoras de gelo (INA ⁺)	NuFarm Inc. (USA)
Cedomon	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Manchas foliares de cereais, <i>Fusarium</i> sp	BioAgri AB (Suécia)
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GBO3, <i>Bacillus</i> spp. <i>Burkholderia cepacia</i> Tipo Wisconsin	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Phytophthora</i>	Growth Products (USA)
Deny		<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. e alguns nematóides	StineMicrobial Products (USA)
EcoGuard	<i>B.licheniformis</i> SB 3086	<i>Sclerotinia homeocarpa</i> em gramados	NovozymesBiologicals, Inc. (USA)
Galltrol	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AgBiochem (USA)
HiStick N/T	<i>B.subtilis</i> MBI600 + <i>Rhizobium</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Aspergillus</i>	Becker Underwood (USA)
Intercept	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Rhizoctonia solani.</i> , <i>Pythium</i> spp., e <i>Fusarium</i> spp.	Soil Technologies Corp. (USA)
Kodiak	<i>B. subtilis</i> GBO3	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp e <i>Penicillium</i> spp	Gustafson, Inc. (USA)
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviride</i> K61	<i>Alternaria Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	Kemira Agro Oy (Finlândia)
Nogall	<i>A. radiobacter</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Bio-care technology (Austrália)
Rhizo-Plus	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Streptomyces scabies</i>	KFZBBiotechnik GmbH (Alemanha)
Serenade	<i>B. subtilis</i> QWT713	Míldio, oídio, mancha de <i>Cercospora</i> , queima da macieira e outros	Agra Quest, Inc. (USA)
Subtilex	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp	Becker Underwood (USA)
YieldShield	<i>B.pumillus</i> GB34	Doenças causadas por patógenos habitantes do solo	Gustafson Inc. (USA)

Fonte: Adaptado de: MARIANO et al. (2004).

A relação entre microrganismos e compostos voláteis ainda não está totalmente compreendida e muitos compostos ainda continuam sendo identificados (CHUANKUN et al., 2004).

2.1.11 Importância dos sistemas automáticos na identificação de RPCPs

Estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos a despeito da grande importância na manutenção da biosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As técnicas fenotípicas, comumente utilizadas, demandam tempo maior de análise e, na maioria dos casos, são necessários vários testes para uma identificação em nível de espécie (GANDRA et al., 2008; TAMARAPU; MCKILLIP; DRAKE, 2001), podendo ocorrer variabilidade de resultados, como ocorrência de resultados falso-negativos, reflexo da ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, (FARBER et al., 2001; MARIN; LEMOS; FREITAS, 2006).

A necessidade de padronização de provas, agilidade do processo e redução de custos impulsionou o surgimento de sistemas comerciais que podem variar entre manuais, semi-automatizados e automatizados. Estes sistemas permitem a inoculação simultânea de uma série de provas bioquímicas miniaturizadas, cujos resultados podem ser obtidos em curtos períodos de tempo (de duas a quatro horas) caso a detecção seja baseada na presença de enzimas e/ou produtos celulares pré-sintetizados, ou em períodos mais extensos caso o sistema seja dependente do crescimento bacteriano (ASLANZADEH, 2006).

Entre os sistemas comerciais mais difundidos está o VITEK 2 Identification System® (bioMérieux) Compact-colorimétrico, que de acordo com Nakasone et al. (2007), foi avaliado pelo desempenho, precisão e rapidez para identificar isolados de diversas espécies de bactérias, sendo altamente aceitável nos laboratórios de microbiologia.

2.1.12 Importância de técnicas moleculares no estudo da identificação e diversidade de RPCPs

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular trouxe notáveis avanços para a identificação de micro-organismos. Os ensaios baseados na análise de DNA têm como vantagem a utilização de uma informação estável e independente da necessidade de condições para ativação ou inativação de expressão dos genes (JAMNINES; DE VOS, 2009; NOCKER; BURR; CAMPER, 2007).

A utilização de técnicas moleculares para identificar os micro-organismos do solo é fundamental para o estudo da ecologia da rizosfera, porque é rápido, não exige qualquer conhecimento prévio de micro-organismos para a caracterização e os resultados são bases de dados globais (PÜHLER et al., 2004).

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH; NITSCHKO, 1999).

A evolução de alguns genes de bactérias processa-se numa taxa constante por mutação e seleção darwiniana e a historia evolutiva do gene RNAr 16S aproxima-se da historia evolutiva do genoma total, tornando-se, desta forma, aceitável reconstruir relações evolucionarias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de RNAr 16S (VAN BERKUN et al., 2000).

Segundo Gevers et al. (2006) a taxonomia é tradicionalmente dividida em três partes:

1. Classificação: ordenação dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade entre eles.
2. Nomenclatura: rotulagem das unidades definidas na classificação.

3. Identificação dos organismos desconhecidos: determinações de quais organismos pertencem às unidades genômicas e ecológicas pré-existentes.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que compartilham 70% ou mais de hibridização DNA-DNA (WAYNE et al., 1987). É uma categoria que circunscreve um grupo de indivíduos (estirpes/isolados) coerentes genomicamente, que apresentam um alto grau de similaridade, em muitos aspectos independentes, testados comparativamente sob condições padronizadas (STACKEBRANDT et al., 2002).

Nesta abordagem uma árvore filogenética de RNAr 16S é a base para construir a classificação das bactérias e a validação multidimensional é feita examinando-se as várias características moleculares e fenotípicas dos organismos em questão. Esta metodologia é considerada a abordagem padrão na sistemática bacteriana moderna (BOONE et al. 2001; STACKENBRANDT et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cultivo

Os isolados utilizados neste estudo estavam misturados em caldo nutritivo, contidos em Balão de Erlenmeyer, denominados ALF, T3, T6 e T7, previamente removidos de raízes de plantações de hortaliças do Centro de Ciências Agrárias (CECA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Município de Rio Largo/Alagoas, do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), Município de Satuba/Alagoas e feira livre de orgânicos de Arapiraca e Santana do Mundaú/Alagoas, respectivamente. As misturas bacterianas foram cedidas pela Professora Dra. Tânia Marta Carvalho dos Santos, Coordenadora do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL.

No Laboratório de microbiologia de alimentos e de Microbiologia Clínica do LACEN foram realizadas repicagens dos isolados, utilizando-se inicialmente uma alíquota de 100µL de cada mistura, distribuída em diferentes meio de cultura (Agar-sangue e Levin, preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes), em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, espalhadas com alça de Drigalsky e, em seguida, as culturas foram incubadas em incubadora BOD a 28°C. O mesmo procedimento foi repetido em meio BD CHROM agar, onde as colônias formadas com coloração e morfologia diferentes, foram repicadas com alça de platina, sucessivamente, para o meio BD CHROM Agar; -BD MPac-Agar-Pseudomonas e Agar-Cled – BIOGEN, por ser um meio deficiente em eletrólitos, possibilitando o isolamento do gênero *Proteus* sp, devido os isolados presentes serem móveis, facilitando a contaminação entre os mesmos.

3.2 Testes bioquímicos para identificação dos isolados

As colônias isoladas foram submetidas aos testes bioquímicos no Laboratório de microbiologia Clínica do LACEN. Para o teste de Gram foi utilizado o método da coloração de Gram de acordo com Mariano e Silveira (2005), que é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem.

Os testes bioquímicos: Ala-Fe-Pro Arilamidase, Adonitol, L-Pirrolidonil-Arilamidase, L-Arabitól, D-Celobiose, Beta galactosidase, Produção de H₂S, Beta-N-acetil-glucosaminidase, Glutamil Arilamidase pNA, D-Glucose, Gama-glutamyl-transferase, Fermentação/glucose, Beta-Glucosidase, D-Maltose, D-Manitol, D-Manose, Beta-Xilosidase, Beta-Alanina arilamidase pNA, L-Prolina Arilamidase, Lipase, Palatinose, Tirosina Arilamidase, Urease, D-Sorbitol, Sacarose, D-Tagatose, D Trealose, Citrato (Sódio), Malonato, 5-ceto-D-Gluconato, Alcalinização LLactato, Alfa-Glucosidase, Alcalinização Succinato, Beta-N-Acetil Galactosaminidase, Alfa-Galactosidase, Fosfatase, Assimilação Glicina Arilamidase, Ornitina Descarboxilase, Lisina Descarboxilase, Assimilação de L Histidina, Cumarato, Beta-Glucoronidase, Resistência O/129, Glu-Gli- ArgArilamidase, Assimilação L-Malato, ELLMAN, Assimilação L-Lactato, foram realizados utilizando o sistema automatizado Vitek 2, que Utiliza cartões compostos por micro-poços contendo substratos liofilizados, com provas bioquímicas para identificação dos micro-organismos e leitura de provas miniaturizadas, e como controle negativo, um poço que é utilizado como referência do valor de base, compreendendo um total de 47 provas bioquímicas.

Colônias de cada isolado, com 18-24 horas de cultivo foram ressuspensas em NaCl -0,85%, em tubo de ensaio, para ser conectado através de um pequeno tubo, ao cartão com provas bioquímicas miniaturizadas para bactéria Gram – ou + e em seguida, foram colocados no Vitek 2, para leitura e identificação dos isolados, de acordo com as especificações do fabricante.

Os resultados dos testes bioquímicos realizados no VITEK 2, são obtidos em tempo aproximado de 3 horas e classificados em categorias, dependendo do grau de discriminação, sendo excelente (96-99% de probabilidade), muito bom (93-95% de probabilidade), bom (89-92% de probabilidade), aceitável (85-88% de probabilidade), além de fraca discriminação e não identificado (OTTO-KARG et al., 2009).

3.3 Análises das sequências do RNAr 16S

3.3.1 Extração de DNA genômico e identificação dos isolados pelo seqüenciamento do gene RNAr 16S

No Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) – do Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL, cada isolado bacteriano foi cultivado em 10 mL de meio líquido caldo nutriente (Himedia) em tubos de vidro com 15 cm x 1,5 cm com tampa de rosca, sob agitação de 142 rpm à 28 °C durante 48 horas. Cada cultura líquida foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, utilizando-se centrífuga Eppendorf (mod. 5415C) e o sobrenadante descartado. O DNA genômico total foi extraído, segundo protocolo de Ausubel et al. (1992), quantificado em gel de agarose a 8% em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) e corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL.

Para comparação e quantificação do DNA foi utilizado o marcador 100 pb (Ludwig Biotec) e em seguida o DNA foi visualizado em transluminador UV e documentado com um sistema digital (DigiDoc-It® Imaging System).

3.3.2 Amplificação do RNAr 16S bacteriano

No Laboratório de Biologia Vegetal (BIOVEG) - CECA, foi realizada a amplificação de aproximadamente 500 pares de bases (pb) do RNAr 16S bacteriano, utilizando os primers universais EUBF 933: 5' GCACAAGCGGTGGAGCATGTG e EUBr 1387: 5' GCCCGGGAACGTATTCACCG (IWAMOTO et al., 2000). Os reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as suas respectivas concentrações estão descritos na Tabela 2.

As reações foram realizadas para um volume final de 50 µl e conduzidas em termociclador (Veriti® Thermal Cycler - Applied Biosystems) ao longo de 35 ciclos de amplificação, em quatro etapas distintas:

ETAPA 1: Desnaturação da fita de DNA viral a 94 °C por 30 segundos.

ETAPA 2: Anelamento dos primers a 56 °C por 1 minuto.

ETAPA 3: Extensão das novas fitas de DNA a 72 °C por 1 minuto.

ETAPA FINAL: Extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2 – Concentração final dos reagentes utilizados para reação de PCR/Região ITS 16S.

Componentes	Concentração final
Água Milli-Q	q.s.p
Tampão 10 X	1 x
MgCl ₂	3mM
DNTPs	0,2mM
Primer EUBF933	0.5µM
Primer EUBR1387	0.5µM
Taq DNAPolimerase	2,5 U
DNA	40ng

Fonte: Autora, 2012.

Os fragmentos de RNAr 16S bacteriano amplificados foram submetidos à eletroforese a 4V/cm, em gel de agarose a 1,2% e em seguida corado com brometo de etídio (EtBr). Para estimar o peso molecular da amostra foi utilizado um marcador de 100 pb (Ludwig Biotec) e em seguida o RNAr 16S foi visualizado em transluminador UV e fotografado com um sistema digital (DigiDoc-It® Imaging System).

3.3.3 Sequenciamento do fragmento de RNAr 16S bacteriano

O seqüenciamento direto dos produtos de PCR foi realizado pela empresa MACROGEN Inc, Seoul, Coréia do Sul. As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) "National Center for Biotechnology Information" utilizando a ferramenta BLAST, "Basic Local Alignment Search Tool" (ALTSCHUL et al., 1997).

Para determinar a porcentagem de identidade de seqüência nucleotídica entre os isolados bacterianos desse trabalho e outras seqüências de bactérias depositadas no GenBank, foram realizadas análise adicionais de comparação par a par de nucleotídeos (*pairwise*) com o programa DNAMan v.6.0 (LynnonCo.), utilizando a opção alinhamento ótimo seguindo parâmetros: Ktuple = 2, Gap penalty = 7, Gap open = 10, Gap extension = 5.

3.3.4 Análise filogenética

A análise filogenética constituiu-se da construção de uma árvore com base no método “*Maximum Likelihood*” (Máxima Verossimilhança), utilizando aproximadamente 400 nucleotídeos da região RNAr 16S dos isolados e outras sequências nucleotídicas de bactérias mais proximamente relacionadas já depositadas no GenBank. Para análise de Máxima Verossimilhança, as sequências nucleotídicas foram inicialmente alinhadas com a ferramenta MUSCLE disponível no programa MEGA 5.05 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

O alinhamento foi posteriormente utilizado para determinação do melhor modelo de substituição de nucleotídeos com a ferramenta “*Find Best-Fit Substitution Model*”, disponível no mesmo programa. O melhor modelo de substituição escolhido foi o Kimura 2 Parâmetros, o qual leva em consideração as taxas de substituição transicional (A <-> G, purina para purina, ou T <-> C, pirimidina para pirimidina) e as taxas de substituição transversional (purina para pirimidina, ou vice-versa). O modelo assume também que todas as bases são igualmente frequentes (KIMURA, 1980). A confiabilidade dos ramos na árvore foi calculada por análise “bootstrap” com 10.000 replicações.

3.4 Determinação do ácido indolacético (AIA)

No LPqRN do Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL, cada isolado foi multiplicado pelo método de riscas sobre meio NYDA (extrato de carne 3, peptona 5, glicose 10, extrato de levedura 5, ágar 18), em placas de Petri, de acordo com Mariano e Silveira (2005). As colônias com 24 horas de crescimento foram removidas da superfície do meio de cultura com alça de platina e colocadas em tubos de ensaio com 0,5 mL de água destilada estéril (ADE). A suspensão bacteriana foi preparada de modo a se obter uma concentração padrão de 10^7 células/mL, de acordo com a Escala de MacFarland (MacFarland, 1970).

Sob agitação em vortex, foi transferido 1 mL de cada suspensão bacteriana para Erlenmeyer com 49 mL de caldo nutriente, pH 7. As culturas foram mantidas a 28 °C, no escuro, sob agitação constante de 142 rpm e após 24 horas, foi transferido uma alíquota de 0,5 mL da suspensão bacteriana para frascos erlenmeyer, com 45 mL do mesmo meio suplementado com 200 µg/mL-1 de triptofano (Merck) (1 mM),

pH 7,0. As culturas foram mantidas a 28 °C, no escuro, sob agitação constante de 142 rpm. Foram coletadas alíquotas de 13 mL de suspensão bacteriana, a cada seis horas, e em seguida agitadas por cinco minutos, de onde foi retirado 3 mL para quantificação da densidade ótica (DO) a 600 nm, e 10 mL centrifugadas a 7.000 xg por 10 minutos a 15°C e o sobrenadante coletado para análise da quantificação de AIA.

A quantidade de AIA por mL de sobrenadante da cultura foi estimada conforme o protocolo de Gordon e Weber (1951), com modificações, que consistiu de uma mistura de 2 mL de reagente de Salkowski (SALKOWSKI; EHMANN, 1977) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2% + H_2SO_4 37%) com 1 mL do sobrenadante da cultura, a qual foi reservada por 30 minutos em ambiente escuro para reação colorimétrica.

A intensidade de cor foi determinada em espectrofotômetro, UV / VIS (Perkin Elmer UV / VIS Lambda 2), com leitura de absorbância a 530 nm conforme Asghar et al. (2002). Foi utilizado o caldo nutriente (1 mL) como “branco” e caldo nutriente com adição de 200 $\mu g/mL^{-1}$ de triptofano (1 mL) como controle negativo. A concentração de AIA foi estimada utilizando uma curva padrão preparada com o meio de cultura, com adição de 200 $\mu g/mL^{-1}$ de triptofano e quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de 1,0 a 200 mg/mL^{-1} de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich) (GALDIANO JUNIOR et al., 2011). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições. As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SISVAR® versão 5.3 de acordo com Ferreira (2008).

3.5 Solubilização de fosfato

No LPqRN do Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL o teste de solubilização de fosfato foi realizado “*in vitro*” para determinar a capacidade dos isolados solubilizar fosfato, pelo uso do meio sólido contendo fosfato.

A metodologia utilizada foi descrita por Cattelan (1999), adaptada de Katznelson e Bose (1959), na qual se utilizou o meio 1/10 NYDA (MARIANO, 2005), acrescido de $CaHPO_4$. O precipitado fino de $CaHPO_4$ resultou da reação de 50 mL da solução de K_2HPO_4 0,57 M e de 100 mL da solução de $CaCl_2$ 0,9 M adicionados a 850 mL de 1/10 NYDA. As soluções e o meio foram autoclavados separadamente.

O pH do meio foi ajustado para 7,0 e distribuído em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro. Utilizando-se alça de platina cada isolado foi repicado para quatro placas. As culturas foram incubadas a 28 °C, por sete dias e observados halos de solubilização de fosfato em torno das colônias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições de acordo com Ferreira (2008).

3.6 Antagonismo indireto a fungos fitopatogênicos (compostos voláteis)

No LPqRN do Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL, as seis rizobactérias em estudo foram avaliadas quanto ao antagonismo indireto aos fungos fitopatogênicos: *Pythium* sp, *Colletotrichum* sp (mandioca), *Colletotrichum musae* (banana), *Colletotrichum* sp (tomate), *Colletotrichum* sp (fava), *Cercosporidium* sp (uruçu), *Curvularia* sp (cana-de-açúcar) e *Sclerotium* sp (fava), pertencente da coleção da Clínica de Diagnóstico Vegetal do CECA, cedidos pelo Professor Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior.

O método usado foi o de placas sobre postas, também chamado de método para detecção de metabólitos voláteis (CATELLAN, 1999). Em placa de Petri de 6,0 cm contendo meio BDA, foi depositado um disco do micélio (aproximadamente 6 mm) com crescimento ativo do fungo (DA LUZ, 1990) sobre a área central do meio de cultura. Essa placa foi inserida dentro de outra placa de 90 mm, também, na área central, contendo o meio NYDA em torno da placa de 60 mm, onde colônias dos isolados com 24 horas de crescimento foram transferidas com alça de platina e inoculadas pelo método em riscas (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Como testemunha foi utilizada a mesma metodologia sem adição das bactérias. As culturas foram incubadas a 28 °C ± 2 °C. A taxa de crescimento fúngico foi registrada aos 07 (sete) dias, pela medição do diâmetro da colônia sobre o eixo que liga os dois vértices da borda do compartimento. O arranjo experimental foi inteiramente casualizado, com 56 tratamentos, em arranjo fatorial 7x8 (isolados bacterianos mais testemunha x fungos fitopatogênicos) com 4 repetições para cada tratamento). As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SISVAR® versão 5.3 de acordo com Ferreira (2008).

3.7 Avaliação do desenvolvimento mudas de couve, pimentão e tomate em casa de vegetação

Foi realizado um pré-experimento nas dependências do CECA da UFAL, com quatro misturas bacterianas, previamente removidas de raízes de hortaliças. As misturas foram inoculadas em sementes de culturas de hortaliças (couve, pimentão e tomate - Feltrim S.A., rotuladas com o percentual de germinação: 93%, 90% e 92% respectivamente, foram obtidas em casas comerciais de Maceió-AL.).

A fim de se eliminar o excesso de fungicidas e outros contaminantes, inicialmente as sementes foram submetidas à assepsia superficial: etanol 70% por 1 min, solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min e três enxágues com água destilada esterilizada e secadas em papel toalha estéril (adaptado de CARVALHO et al., 2009), semeadas em substrato vermiculita estéril (autoclavado a 120 °C por 20 minutos) acondicionado em copos plásticos descartáveis de 300 mL, sob condição de casa de vegetação e, após 25 dias foram avaliadas as variáveis: Comprimento da raiz (CR), utilizando uma régua milimétrica; número de folhas (NF), através da contagem direta; peso matéria seca: da parte aérea (PMSPA), de raiz (PMSR), total (PMST); determinado por meio de secagem do material em estufa a 70 °C, até atingir massa constante; a área foliar (AF) foi determinada utilizando o equipamento modelo LI – 3100 C, de acordo com as recomendações do fabricante (LI – COR Biociencias) no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, do CECA da UFAL.

O experimento definitivo foi realizado no LPqRN e em casa de vegetação do Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL, com as seis rizobactérias isoladas e a mistura dos isolados para bacterização de sementes de couve, pimentão e tomate. Cada isolado foi multiplicado pelo método de riscas sobre meio nutritivo ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura contido em placas de Petri (MARIANO; SILVEIRA, 2005). As células foram removidas da superfície do meio de cultura com alça de platina e colocadas em água esterilizada (ADE). A suspensão bacteriana com concentração de 10^7 UFC/mL (PINTON et al., 2010), estimada com a Escala de MacFarland (1970), foi preparada a partir da adição de 20 mL de ADE em cada placa contendo o crescimento bacteriano, sendo transferido com pipeta estéril, para tubo de ensaio, ajustando a concentração padrão com adição de ADE. Para a

suspensão da mistura dos isolados, foi adicionado uma colônia de cada isolado, em único tubo de ensaio com ADE, até se obter a suspensão com concentração padrão.

As sementes foram submersas em um volume aproximado de 0,5 mL de suspensão bacteriana, por um período de 60 minutos e posteriormente foram secadas em papel toalha, por 12 horas, em condições normais de laboratório. Como controle, as sementes foram somente, embebidas em ADE por 60 minutos e em seguida secadas da mesma maneira que as tratadas com as rizobactérias método adaptado de Luz (2001) e Carvalho et al. (2009).

As sementes bacterizadas e as do controle foram encaminhadas para casa de vegetação e semeadas em substrato vermiculita estéril, acondicionado em copos plásticos descartáveis de 300 mL. Foram regadas manualmente, diariamente. As avaliações foram realizadas após 25 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em desenho fatorial 8x3 (seis bactérias, mistura dos isolados e testemunha x três hortaliças) com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com planta.

Após 25 dias de cultivo as mudas das hortaliças foram coletadas e avaliadas as variáveis de acordo com a metodologia citada para o pré-experimento.

3.8 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SISVAR® versão 5.3 de acordo com Ferreira (2008). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em caso de significância estatística do efeito do tratamento, os mesmos foram agrupados pelo teste de Scott-Knot ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e obtenção dos isolados

Das quatro misturas utilizadas, foram obtidos oito isolados sendo todos gram negativos, dos quais, seis foram identificadas pelo sistema Vitek 2 (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação bioquímica automatizada dos isolados, realizada pelo Sistema VITEK® 2 Compact.

Nº	Testes Bioquímicos	Iso.1	Iso.2	Iso.4	Iso.5	Iso.6	Iso.8
2	APPA(Ala-Phe-Pro-Arylamidase)	-	+	-	-	-	-
3	ADO (Adonitol)	-	-	-	-	+	+
4	PyrA (L-Pyrrolydonil Arylamidase)	-	+	-	-	-	+
5	IARL (L-Arabitol)	-	-	-	-	-	-
7	dCEL (D-Cellobiose)	-	-	-	-	-	-
9	BGAL (Beta- Galactpsidase)	-	-	-	-	-	-
10	H ₂ S (Production)	-	-	-	+	-	-
11	BNAG(Beta-N-Acetyl-Glucosanidase)	-	-	-	-	-	+
12	AGLTp (Glutamyl Arylamidase pNA)	-	+	-	-	-	-
13	dGLU (D-Glucose)	-	-	+	+	+	+
14	GGT(Gama-Glutamil Transferase)	-	-	+	+	-	-
15	OFF (Fermentation/Glucose)	-	-	-	-	+	+
17	BGLU (Beta-Glucosidase)	-	-	-	-	+	+
18	dMAL (D-Maltose)	-	-	-	+	-	-
19	dMAN (D-Manitol)	-	-	-	-	+	+
20	dMNE (D-Manose)	-	-	+	-	+	+
21	BXYL (Beta-Xilosidase)	-	-	-	-	-	-
22	BAlap (Beta-Alanine Arylamida)	-	-	-	-	-	-
23	ProA (L-Proline Arylamidase)	+	-	+	-	-	+
26	LIP (Lipase)	-	-	-	-	-	-
27	PLE (Palatinose)	-	-	-	-	-	-
29	TyrA (Tyrosine Arylamidase)	-	-	+	-	-	-
31	URE (Urease)	-	+	-	+	+	+
32	dSOR (D-Sorbitol)	-	-	-	-	-	+
33	SAC (Saccharose/Sucrose)	-	-	-	-	-	+
34	dTAG (D-Tagatose)	-	-	-	-	-	-
35	dTRE (D-Trehalose)	-	-	-	-	-	+
36	CIT (Citrate-Sodium)	+	-	+	-	+	+
37	MNT (Malonate)	+	-	-	-	-	-
39	5KG (5-Keto-D-Gluconate)	-	-	-	-	-	(-)
40	ILATk (L-Lactate Alkalinisation)	+	-	+	-	-	+
41	AGLU (Alpha-Glucosidase)	-	-	-	+	-	-
42	SUCT (Succinate Alkalinisation)	+	-	+	-	+	+
43	NAGA(Beta-N-Acetyl Galactosanidase)	-	-	-	-	-	-
44	AGAL (Alpha-GalactosidasE)	-	-	-	-	-	-
45	PHOS (Phosphatase)	-	+	-	+	+	+
46	GlyA (Glycine Arylamidase)	-	-	-	-	-	-
47	ODC (Ornithine Decarboxilase)	-	-	-	-	-	+
48	LDC (Lysine Decarboxilase)	-	-	-	-	-	+
53	IHISa (L-Histidine assimitation)	-	-	-	-	-	-
56	CMT (Coumarate)	-	-	+	+	-	+
57	BGUR (Beta Glucuronidase)	-	-	-	-	-	-
58	O129R (Resistance (Comp. Vibio.)	-	-	+	+	-	+
59	GGAA (Glu-Gly-Arylamidase)	-	-	-	-	-	+
61	IMLTa (L-Malate - assilation)	-	-	-	-	-	-
62	ELLM (ELLMAN)	-	-	-	+	+	-
64	ILATa (L-Lactate assimilation)	-	-	+	-	-	-

Fonte: Autora, 2013.

Nota: Iso.1 *Alcaligenes faecalis* spp *faecalis*; Iso.2 *Miroydes* spp; Iso.4 *Pseudomonas putida*; Iso.5 *Proteus vulgaris*; Iso.6 *Providencia rettgeri*; Iso.8 *Serratia marcescens*.

De acordo com os testes bioquímicos analisados (Tabela 3) os resultados das identificações foram: Isolado 1- *Alcaligenes faecalis* ssp *faecalis*, com 99% probabilidade; isolado 2 - *Myroides* spp, com 98% probabilidade; isolado 4 - *Pseudomonas putida*, com 99% probabilidade; isolado 5 - *Proteus vulgaris* group, com 99% probabilidade; isolado 6 - *Providencia rettgeri*, com 99% probabilidade e isolado 8 - *Serratia marcescens*, com 95% probabilidade.

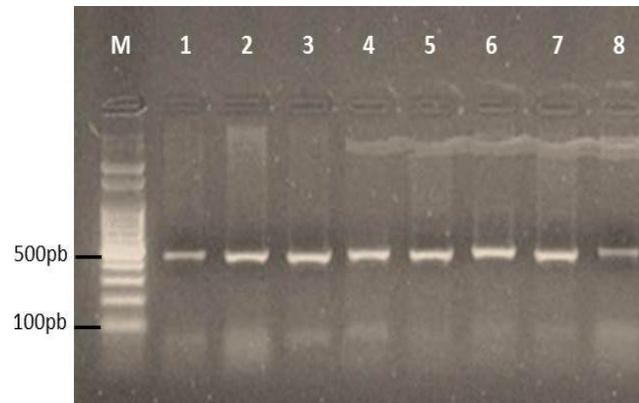
Segundo Farber et al. (2001), quando se emprega um número limitado de testes os resultados bioquímicos utilizados para identificação e biotipagem de bactéria, podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além de outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em micro-organismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas. Recomenda-se também que a precisão de um sistema automatizado exceda 90% na sua habilidade em identificar micro-organismos e que este seja capaz de identificar organismos comumente isolados com no mínimo 95% de precisão comparada com as precisões de métodos convencionais (O'HARA, 2006).

De acordo com Otto-Karg et al. (2009), os resultados foram considerados satisfatórios tanto quantitativamente com o uso dos 47 testes, providos pelo sistema Vitek 2, como qualitativamente, por ter sido avaliada a utilização da fonte de carbono e a atividade enzimática, categorizados pelo software, de muito bom a excelente.

4.2 Identificação das rizobactérias através do seqüenciamento do RNAr 16S

A identificação via seqüenciamento do RNAr 16S dos isolados de rizobactérias 1A, 2A, 4A, 5A, 6A e 8A, foi realizada com a finalidade de confirmar a identidade das espécies definidas com base nos testes bioquímicos utilizados no sistema automatizado VITEK 2. A partir da amplificação parcial do gene do RNAr 16S, foram obtidos produtos de PCR com tamanho de aproximadamente 550 (pb) para os seis isolados das rizobactérias (Figura 2). As sequências nucleotídicas correspondentes aos produtos de PCR de cada isolado foram determinadas por seqüenciamento de RNAr 16S, sendo observado que os isolados 1, 3 e 7 são iguais.

Figura 2 – Padrão eletroforético da amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 500pb do gene RNAr 16S em gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais EUBR1387R EUBF 933.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: (M) Marcador de peso molecular (100pb). Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 representam os isolados 1A , 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A e 8A, respectivamente.

A partir do resultado do sequenciamento, as sequências do RNAr 16S foram submetidas ao algoritmo BLASTn(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e revelaram elevada identidade de nucleotídeos com espécies de bactérias disponíveis no Genbank pertencentes a seis gêneros distintos. Espécies que compartilharam mais de 95% de identidade de nucleotídeos com os seis isolados bacterianos foram selecionadas para análises de comparação par a par de sequências: PAirwise Sequence Comparison(PASC) (Figura7; Tabela 4).

Na análise PASC, o isolado 1A (gb|KC693027) foi mais relacionado às espécies: *Alcaligenes faecalis*, *A. faecalis* subsp *faecalis*, *A. faecalis* subsp *Parafaecalis* com 99% de identidade de nucleotídeos, no entanto não foi possível caracterizar em subespécie. Este resultado corrobora com as análises bioquímicas, as quais identificaram este isolado como *A. faecalis* subsp *faecalis*, com 99% de probabilidade.

A sequência RNAr 16S do isolado 2A (gb|KC693028) apresentou 100% identidade com a espécie *Myroides odoratus*. Este isolado foi identificado apenas como pertencente ao gênero *Myroides* spp, pelos testes bioquímicos disponíveis no VITEK 2. O isolado 4A (gb|KC693026), compartilhou 100% de identidade com as espécies *Pseudomonas putida* e *P. rhizosphaerae*. Por meio de testes bioquímicos este isolado foi identificado como *P. putida* com 99% de probabilidade.

O isolado 5A (gb|KC693029), foi 100% idêntico às espécies *Proteus penneri* e *P. vulgaris*. Este isolado foi caracterizado bioquimicamente como *P. vulgaris* com 99% de probabilidade. O isolado 6A (gb|KC693030) apresentou 97% identidade, com as espécies *Providencia rettgeri* e *P. vermicola*. Análises bioquímicas pelo sistema VITEK 2 identificaram esta espécie como *P. rettgeri*, com 99% de probabilidade. Por fim, o isolado 8A (gb|KC693031) compartilhou 100% de identidade com *Serratia marcescens* e *S. nematodiphila*. No entanto, o isolado 8A foi bioquimicamente identificado satisfatoriamente como *Serratia marcescens* pelo sistema automatizado VITEK 2 com 95% de probabilidade.

O relacionamento filogenético dos isolados bacterianos foi determinado por meio de uma árvore de Máxima Verossimilhança baseada em aproximadamente 500 nucleotídeos da região RNAr 16S das mesmas. Além dos seis isolados deste trabalho a árvore contém 17 outras sequências nucleotídicas de bactérias proximamente relacionadas às quais estão depositadas no Gen Bank (Tabela 4).

Os seis isolados foram distribuídos em seis diferentes grupos, os quais corresponderam aos gêneros, *Alcaligenes* sp, *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Serratia* sp e *Myroides* sp (Figura 3).

O grupo um, representado pelo gênero *Alcaligenes*, engloba o isolado 1A (gb|KC693027) o qual agrupou em um ramo com 100% de probabilidade com as espécies *A. faecalis*, *A. faecalis* subsp *faecalis* e *A. faecalis* subsp *Parafaecalis*. Esta relacionada ao controle biológico contra patógenos e promoção de crescimento de plantas (HONDA et al., 1998; SAYYED et al., 2010).

O isolado 4A (gb|KC693026) ocupou o segundo grupo, representado pelo gênero *Pseudomonas*, agrupando com 88% de probabilidade com duas espécies de *P. putida*, uma importante bactéria promotora de crescimento de plantas (MATILLA et al., 2011) e *P. rhizosphaerae*, bactéria isolada de ambiente marinho a qual tem sido relatada como potencial agente de biocontrole (PATERNOSTER et al., 2010).

Figura 3 – Comparações par a par de sequências nucleotídicas do gene 16S RNAr entre os seis isolados de rizobactérias deste trabalho e outras bactérias disponíveis no GenBank.

Bactéria	1A	2A	4A	5A	6A	8A	Ser N	Ser M	Prov V	Prov R	Prot P	Prot V	Alc F	Alc FSF	Alc FSP	Pseud F	Pseud S	Pseud P	Pseud R	Myr M	Myr OM	Myr OT	
1A	100																						
2A	74	100																					
4A	88	80	100																				
5A	79	79	85	100																			
6A	80	77	85	94	100																		
8A	81	77	85	94	96	100																	
Ser N	81	78	85	94	96	100	100																
Ser M	81	78	85	94	96	100	100	100															
Prov V	82	78	86	95	97	98	98	98	100														
Prov R	81	78	85	95	97	98	98	98	99	100													
Prot P	79	79	85	100	94	94	94	94	95	95	100												
Prot V	79	79	85	100	94	94	94	94	95	95	100	100											
Alc F	99	74	87	79	80	81	81	81	99	80	79	79	100										
Alc FSF	99	74	87	79	80	81	81	81	99	80	79	79	100	100									
Alc FSP	99	74	87	79	80	81	81	81	99	80	79	79	100	100	100								
Pseud F	87	80	99	85	85	85	85	85	85	85	85	85	87	87	87	100							
Pseud S	88	80	99	85	85	85	85	85	86	85	85	85	87	87	87	99	100						
Pseud P	88	80	100	85	85	85	85	85	86	85	85	85	87	87	87	99	99	100					
Pseud R	88	80	100	85	85	85	85	85	86	85	85	85	87	87	87	99	99	99	100				
Myr M	74	96	79	77	77	76	77	77	77	77	78	78	73	73	73	79	79	79	79	100			
Myr OM	73	95	79	77	76	76	76	76	77	77	78	78	72	76	72	79	79	79	79	99	100		
Myr OT	74	100	80	79	77	77	78	78	78	78	79	79	74	74	74	80	80	80	80	96	96	100	

Fonte; Autora, 2013.

Nota: 1, 2, 4, 5, 6, 8, isolados bacterianos pertencentes a este trabalho; Ser N – *Serratia nematodiphila*; Ser M – *Serratia marcescens*; Prov V – *Providencia vermicola*; Pro R – *Providencia rettgeri*; Alc F – *Alcaligenes faecalis*; Alc FSF – *Alcaligenes faecalis* subsp *faecalis*; Alc FSP – *Alcaligenes faecalis* subsp *parafaecalis*; Pseud F – *Pseudomonas fluorescens*; Pseud S – *Pseudomonas syringae*; Pseud P – *Pseudomonas putida*; Pseud R – *Pseudomonas rhizosphaerae*; Myr M – *Myroides marinus*; Myr OM – *Myroides odoratmimus*; Myr OT – *Myroides odoratus*.

Tabela 4 – Bactérias depositadas no GenBank proximamente relacionadas aos isolados identificados.

ORGANISMO	FONTE DE ISOLAMENTO	LOCAL	NºGenBank
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>parafaecalis</i>	Resíduos animais	China	KC456571
<i>Alcaligenes faecalis</i>	amostra marinha	Índia	KC433756
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i>	Água residual de esgotos	China	KC456582
<i>Myroides odoratus</i>	Amostra marinha	Índia	EF633228
<i>Myroides marinus</i>	Água residual de esgotos	China	KC456556
<i>Myroides odoratimimus</i>	rizosfera	Índia	GU186112
<i>Proteus penneri</i>	Subsolo congelado	China	KC456568
<i>Proteus vulgaris</i>	Membrana de células combustíveis microbiológicas	China	JQ733140
<i>Providencia rettgeri</i>	Água residual de esgotos	China	KC456592
<i>Providencia vermicola</i>	Resíduos animais	China	KC456588
<i>Pseudomonas putida</i>	Subsolo congelado	China	JX401461
<i>Pseudomonas hizosphaerae</i>	Rizosfera	China	EU834360
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Solo de plantação de rami	China	KC246047
<i>Pseudomonas syringae</i>	Solo	Japão	AB680093
<i>Serratia marcescens</i>	Não disponível	China	JX868557
<i>Serratia nematodiphila</i>	Plantas medicinais	Índia	JQ281540
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Não disponível	Alemaha	AJ459411
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Rizosfera hortaliças	Alagoas/Brasil	KC693027
<i>Myroides</i> sp	Rizosfera hortaliças	Alagoas/Brasil	KC693028
<i>Pseudomonas putida</i>	Rizosfera hortaliças	Alagoas/Brasil	KC693026
<i>Proteus vulgaris</i>	Rizosfera hortaliças	Alagoas/Brasil	KC693029
<i>Providencia</i> sp	Rizosfera hortaliças	Alagoas/Brasil	KC693030
<i>Serratia</i> sp	Rizosfera hortaliças	Alagoas/ Brasil	KC693031

Fonte: autora, 2013.

O terceiro grupo representado pelo gênero *Proteus* sp, incluiu isolado 5A (gb|KC693029), agrupando com as espécies *P. penneri* e *P. vulgaris*. As espécies *P. vulgaris* e *P. penneri* são intimamente relacionadas, sendo diferenciadas pela produção de indol, salicina, esculina e resistência a clorafenicol, os quais não são sintetizados pela última (HICKMAN et al., 1982). A produção de auxina (ácido indol-

3-acético) via triptofano pelo isolado 5A (Figura4), indica que este é indol positivo. Este fato contribui aumentando com a possibilidade deste isolado pertencer à espécie *P. vulgaris*.

O isolado 6A (gb|KC693030) encontra-se no grupo quatro, representado pelo gênero *Providencia* sp, que agrupou mais proximamente com as espécies *P. rettgeri* e *P. vermicola*. A espécie *P. rettgeri*, é um patógeno oportunista, associada à infecções do trato urinário de humanos (MANOS; BELAS, 2006). Até o momento não existem relatos sobre a associação dessa espécie com a rizosfera de plantas. Já *P. vermicola*, apresenta atividade deaminase a qual está relacionada ao aumento do tamanho e número de raízes de feijão-mungo (*Vignaradiata*) (AKHTAR; ALI, 2011).

O quinto grupo, correspondeu ao gênero *Serratia* sp, onde agrupou o isolado 8A (gb|KC693031) juntamente com *S. marcescens* e *S. nematodiphila*. Duas bactérias comumente relatadas como promotoras de crescimento de planta pela indução de resistência contra patógenos da planta, produção de substâncias antagonistas (DE QUEIROZ; MELO, 2006), solubilização de fosfato e produção de auxina (TRIPURA; SASHIDHAR; PODILE, 2007; DASTAGER; DEEPA; PANDEY; 2011).

No sexto e último grupo, representado pelo gênero *Myroides*, se encontra o isolado 2A (gb|KC693028), o qual foi identificado como pertencente a espécie *Myroides odoratus*, com 93% de confiabilidade com base na análise filogenética do RNAr 16S. *Myroides odoratus* tem sido relatado como patógeno oportunista relacionado a infecções hospitalares, além de ser capaz de produzir biofilme (JACOBS; CHENIA, 2009), entretanto, ainda não existe relato sobre seu efeito sobre o crescimento de plantas.

As análises PASC e de filogenia baseada na sequência parcial do gene RNAr 16S permitiu a identificação em nível de gênero dos seis isolados de rizobactérias, entretanto, não foi possível confirmar a identidade das espécies encontradas utilizando o sistema automatizado VITEK 2 (Figura 4).

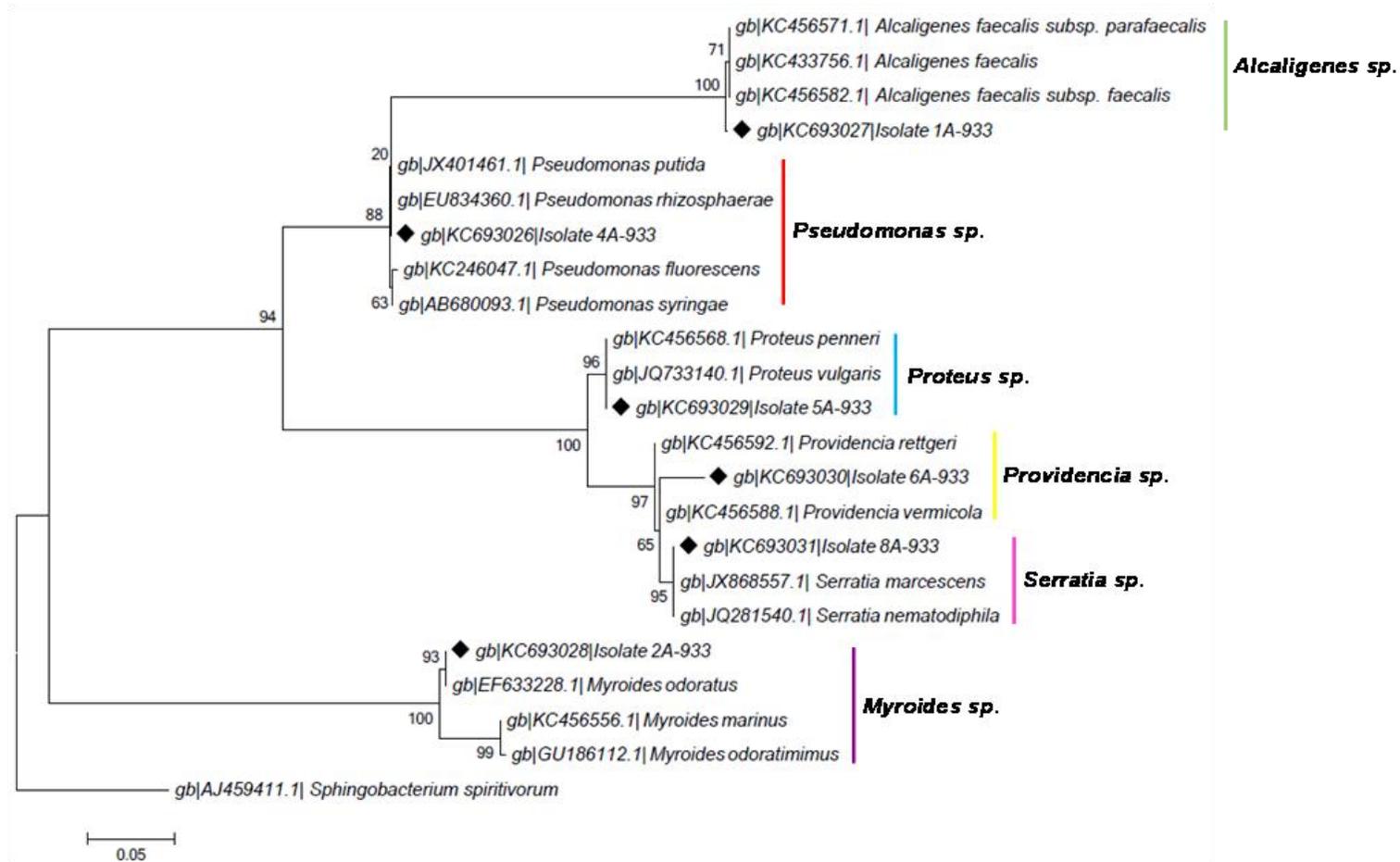
Vários estudos relatam que embora o sequenciamento do gene RNAr 16S seja útil para classificação de bactérias, ele tem baixo poder filogenético em nível de

espécie (BOSSHARD et al., 2006; MIGNARD; FLANDROIS, 2006). Estes estudos sugerem que a sequência desse gene fornece uma identificação em nível de gênero, em mais de 90% dos casos, porém no que diz respeito à espécie a identificação confiável ocorre em apenas em 65-83% dos casos (DRANCOURT et al., 2000; WOO et al., 2003; BOSSHARD et al., 2006; MIGNARD; FLANDROIS, 2006).

O principal fator que contribuiu para impossibilidade da identificação dos seis isolados de rizobactéria em nível de espécie foi o tamanho do fragmento do gene RNAr 16S utilizado nas análises. Os primers universais utilizados produziram um fragmento de aproximadamente 500 pb, o que corresponde apenas a 1/3 da sequência completa que é de aproximadamente 1.500 pb. Com este fragmento não foi possível refletir diferenças nucleotídicas suficientes para permitir a distinção segura entre os isolados 1A, 2A, 4A, 5A e 6A e outras espécies estreitamente relacionadas pertencentes *Alcaligenes* sp, *Myroides* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Pseudomonas* sp e *Serratia* sp.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jill E e Clarridge III (2004), que determinou o relacionamento entre espécies estreitamente relacionadas pertencentes ao gênero *Brevibacterium* sp, observando que três isolados de *B. mcbrellneri* não mostraram diferenças nos 500 pb iniciais. Porém, estes isolados apresentaram cinco ou seis diferenças nucleotídicas quando utilizada uma sequência de no mínimo 1000 pb, possibilitando assim sua separação. No entanto, a maioria dos isolados bacterianos de importância clínica pode ser identificado em nível de espécie utilizando apenas 500 pb (WOO et al., 2003).

Figura 4 – Árvore de Máxima Verossimilhança baseada na sequência parcial do gene RNAr 16S entre as rizobactérias.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: 1A, 2A, 4A, 5A e 6A e outras bactérias mais próximas selecionadas pela análise BLAST. A espécie *Sphingobacterium spiritivorum* foi utilizada como outgroup. A barra indicando 0.05 significa o número de substituições, a cada cem nucleotídeos.

A identificação de bactérias ambientais é mais complicada devido a uma série de fatores que incluem: a ausência ou dificuldade de cultivar estas espécies (TYSON et al., 2004); bases de dados de referência contêm muitas sequências que representam um determinado ambiente e poucas sequências associadas a outros ambientes (WANG; GARRITY; TIEDJE, 2007; WU et al., 2008); nenhum primer é verdadeiramente “universal” e diferentes primers atingem diferentes proporções de sequências em cada ambiente e as regiões alvo desses primers são variavelmente informativas (SOERGEL et al., 2012). Estes fatores contribuem para um número reduzido de estudos e conseqüentemente um reduzido número de sequências de bactérias ambientais disponíveis nos bancos de dados de referência, quando comparadas às bactérias de importância clínica.

Devido à conservação evolutiva do gene do RNAr 16S torna-se difícil discriminar o relacionamento filogenético entre espécies intimamente relacionadas, ou seja, aquelas que apresentam alta identidade ou similaridade de sequência (JANDA; ABBOTT, 2007). Existem vários relatos de gêneros e espécies bacterianas com problemas de identificação com base em identidade de sequência do gene RNAr 16S. O gênero *Bacillus* é um bom exemplo, uma vez que as espécies *B. cereus* e *B. anthracis* apresentam sequência idênticas para o gene do RNAr 16S (PETTI, 2007). Uma identidade de sequência de 100% entre sequências parciais do gene do RNAr 16S foi observada entre o isolado 4A, *Pseudomonas putida* e *P. rhizosphaerae*; entre o isolado 5A, *Proteus vulgaris* e *P. penneri* e entre o isolado 8A, *Serratia marcescens* e *S. nematodiphila* (Figuras 3 e 4, Tabela 4 - comparação de sequência e árvore).

A análise filogenética baseada na sequência completa do gene do RNAr 16S entre todas as espécies do gênero *Pseudomonas* revelou que *P. rhizosphaerae* é mais intimamente relacionada à espécie *P. graminis*, com qual compartilha 99% de identidade (PEIX et al., 2003). As espécies *S. marcescens* e *S. nematodiphila*, compartilham elevada identidade de sequência (98.5 - 98.7%) entre seus genes do RNAr 16S, sendo estas separadas com base na sequência do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) (ZHANG et al., 2009).

Proteus penneri é uma espécie muito próxima de *P. vulgaris*, o que consiste com o fato desta ser inicialmente considerada como *P. vulgaris* biogrupo1, com

base em características bioquímicas. Estas espécies compartilham 100% de identidade para o gene do RNAr 16S, sendo necessária a determinação da sequência espaçadora transcrita localizada entre os RNAr 16S e 23, para separar *P. vulgaris* de *P. penneri* (CAO et al., 2009).

O isolado 6A, bioquimicamente identificado como *Providencia rettgeri* pelo sistema VITEK 2, apresentou uma baixa identidade de sequência (97%) com esta espécie. Esse resultado sugere que o isolado 6A poder ser uma nova espécie do gênero *Providencia*. Este resultado foi corroborado pela análise filogenética, na qual as duas bactérias não compartilharam o mesmo ramo (Figuras 3 e 4, Tabela 4 - comparação de sequência e árvore).

Os isolados bacterianos compartilhando similaridades de sequência do RNAr 16S < 97% indicam que estes pertencem a duas diferentes espécies (DRANCOURT et al., 2000; BOSSHARD et al., 2003). No entanto, escores > 97%, não excluem a possibilidade de este isolado pertencer a uma nova espécie (JANDA; ABBOTT, 2007; PETTIT et al., 2007).

Janda e Abbott (2007), recomendam as seguintes diretrizes para identificação molecular de bactérias com base na sequência do gene do RNAr 16S:

- i) sequenciamento de no mínimo de 500-525 pb, sendo ideal a sequência completa do gene 1.300-1500 pb;
- ii) para identificação em nível de espécie, os isolados devem compartilhar >99% de similaridade de sequência, sendo essencial um escore >99,5% com a espécie tipo ou espécie referência para qual estudo de hibridização DNA-DNA ainda não são disponíveis;
- iii) Isolados intimamente relacionados que apresentam dificuldades de identificação pelo gene do RNAr 16S, requerem a utilização de outro gene “*housekeeping*” (gene constitutivo).

Entre os genes bacterianos utilizados para discriminar espécies bacterianas que não podem ser separadas por identidade de sequência do RNAr 16S, estão o gene *rpoB*, o *tuf* (fator de alongamento TU), *gyrA* e *gyrB* (girase A e B), *sodA*

(superóxido dismutase dependente de manganês), além de proteínas do choque térmico, HSP (PETTIT et al., 2007).

Vale salientar que foram realizadas várias tentativas de sequenciamento da do gene completo do RNAr 16S, com primers universais (PCR 27F, 1488R; PO 27F, EUBR 1387R; 27 F, UNIV 1492) que amplificam 1.500 pb. No entanto, foi sempre observado um padrão de duas bandas.

As bandas obtidas de aproximadamente 1500 pb, da amplificação por PCR do gene RNAr 16S (Figuras 5 e 6) foram purificadas removidas do gel, purificadas e enviadas para sequenciamento. Porém as sequências obtidas não foram de boa qualidade, uma vez que mesmo purificando as bandas do gel, não foi possível realizar a separação. Uma alternativa para solucionar este problema, seria a clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR, já que apenas uma cópia do gene seria introduzida no plasmídio, no entanto permanece a ser desenvolvida.

Diante destes resultados, torna-se necessário o sequenciamento completo gene do RNAr 16S, bem como de um gene adicional a exemplo do *rpoB* para realizar identificação molecular em nível de espécies dos isolados de bacterianos pertencentes a este trabalho.

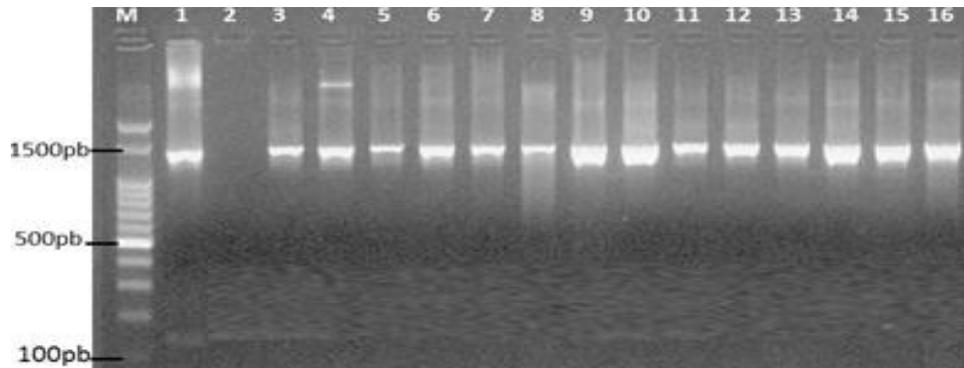
Figura 5 – Padrão eletroforético da amplificação por PCR de fragmentos de aproximadamente 1500 pb do gene RNAr 16S através de gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais 27F e 1488.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: (M) Marcador de peso molecular (1 Kb). Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 representam os isolados 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A e 8A, respectivamente.

Figura 6 – Padrão eletroforético da amplificação por PCR de fragmentos de aproximadamente 1500 pb do gene RNAr 16S através de gel de agarose a 1,2%, utilizando os primers universais PO27F e 1387R.



Fonte: Autora, 2012

Nota: Marcador de peso molecular (100pb). Isolados 1A(1 e 9), 2A (2 e 10), 3A (3 e 11), 4A (4 e 12), 5A (5 e 13), 6A (6 e 14), 7A (7 e 15) e 8A (8 e 16).

4.3 Determinação de AIA sintetizada via triptofano

A curva padrão para quantificação colorimétrica de AIA produzida pelos isolados constou de quinze concentrações de padrão de AIA comercial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e gerou a equação $y = 23,23x - 20,04$, com $R^2 = 0,975$. O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski permitiu quantificar auxina produzida pelos isolados pela manifestação de cor vermelha no meio reacional.

Todos os isolados estudados neste trabalho foram capazes de produzir AIA, no entanto, a produção do isolado de *Serratia*, foi incipiente, 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Figura 11). As maiores concentrações de AIA, neste estudo, foram obtidas pelo isolado de *Providencia* que, com 72 h de crescimento, atingiu a concentração de 24 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ seguida de *Myroides* 23 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, *Alcaligenes* 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, *Pseudomonas* 18,37 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e *Proteus* 16,53 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

Este resultado está de acordo com a literatura que demonstra que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir o regulador de crescimento AIA (LEINHOS; VACEK, 1994; BARAZANI; FRIEDMAN, 1999; KHALID et al., 2004).

Bactérias da rizosfera produtoras de AIA, podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da quantidade do hormônio produzido, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (BROEK et al., 1999).

Narayanaswami e Veerraju (1996) detectaram uma quantidade três vezes maior de AIA em solo rizosférico em relação ao não rizosférico indicando que a produção dessas substâncias por rizobactérias esta diretamente ligada à disponibilidade de exsudatos radiculares (MELO, 1998).

Em plantas, o AIA microbiano produzido por bactérias do gênero *Azospirillum*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter Xanthomonas*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sp, tem sido relacionado ao estímulo de crescimento.

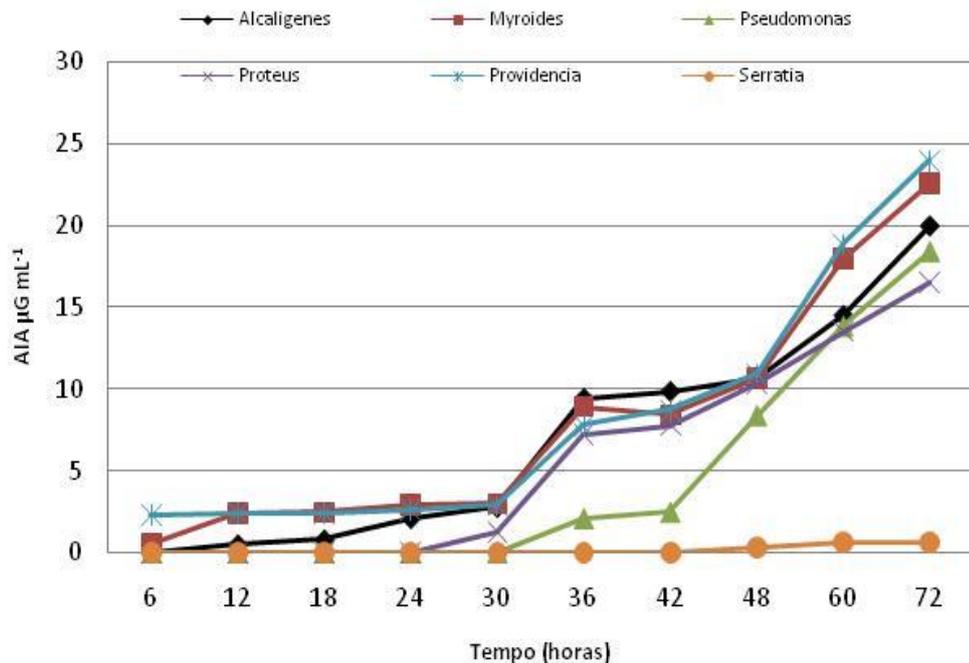
Pedraza et al. (2004) consideraram que as quantidades de AIA excretadas pelos isolados dependem da espécie ou até mesmo da estirpe que está em estudo, assim como das condições em que são cultivados os organismos, tais como: presença ou ausência do precursor do AIA no meio de cultura (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento em que se encontram os isolados.

Os resultados verificados para os isolados de *Providencia* e *Myroides*, superaram a maioria dos relatos na literatura. Diversos trabalhos têm identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA, a saber: Rocha, Fornasier Filho e Barbosa (2011), com valores de 0,8-12 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, Oliveira (2009), com valores de 13,72-19,62 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, Verma, Ladha e Tripathi (2001) com valores de 0,16- 0,70 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, Xie, Pasternak e Glick (1996), com valores de 2,0-8,28 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, Fuentes-Ramirez et al. (1993) com valores de 0,14-2,42 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e Fett, Osman e Dunn (1987) com valores de 0,22-6,37 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

A espécie *Pseudomonas putida* tem sido observada como uma super produtora de AIA, com níveis de AIA de 14,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Trp; 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ com 100 de Trp e 26,2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ com 220 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Trp (PATTEN; GLICK,

2002), no entanto, neste estudo o isolado dessa espécie apresentou resultado inferior.

Figura 7 – Dinâmica de crescimento e concentração de AIA dos 06 isolados.

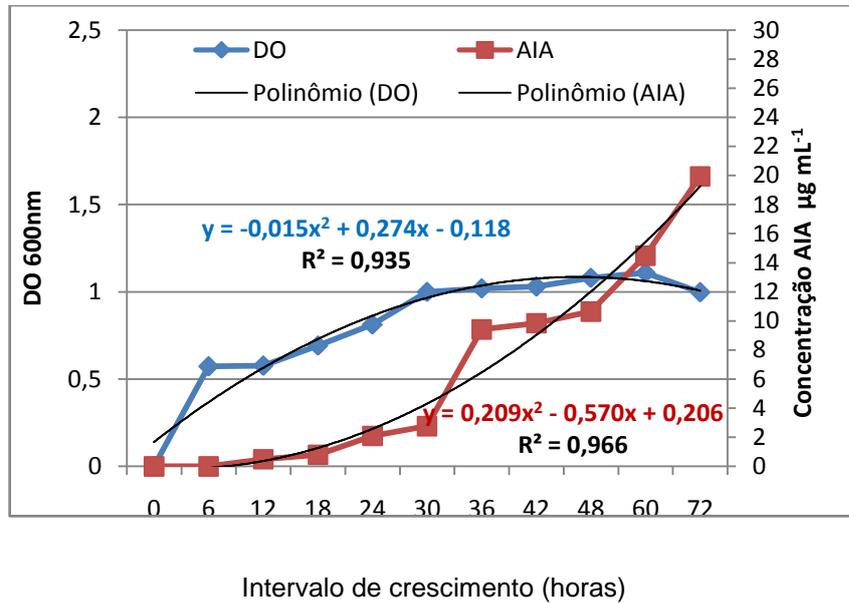


Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano e o crescimento monitorado pela medida da DO a 600 nm, em intervalos de 6 horas de crescimento e concentração da AIA a 530 nm.

Conforme se verifica (Figura 7) os isolados de *Alcaligenes*, *Myroides*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Providencia* iniciaram a produção antes do crescimento bacteriano atingir a fase estacionária, esse efeito pode estar relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano (caldo nutriente) que possui em sua composição extrato de levedura, fonte rica de aminoácidos, inclusive o triptofano (YAMADA et al., 2003). Foi observado que as concentrações de AIA aumentaram a partir de 30 horas de incubação e densidade ótica entre 0,5 e 2,0, não sendo observada queda na produção (Figuras 8-13). Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000), portanto, a carência nutricional pode inibir a produção deste fitormônio.

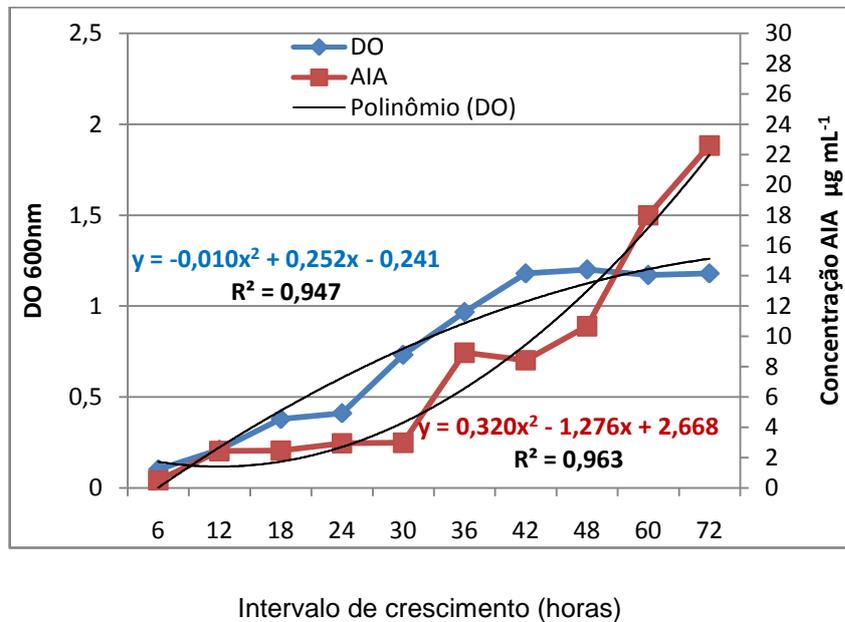
Figura 8 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de *Alcaligenes faecalis*.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

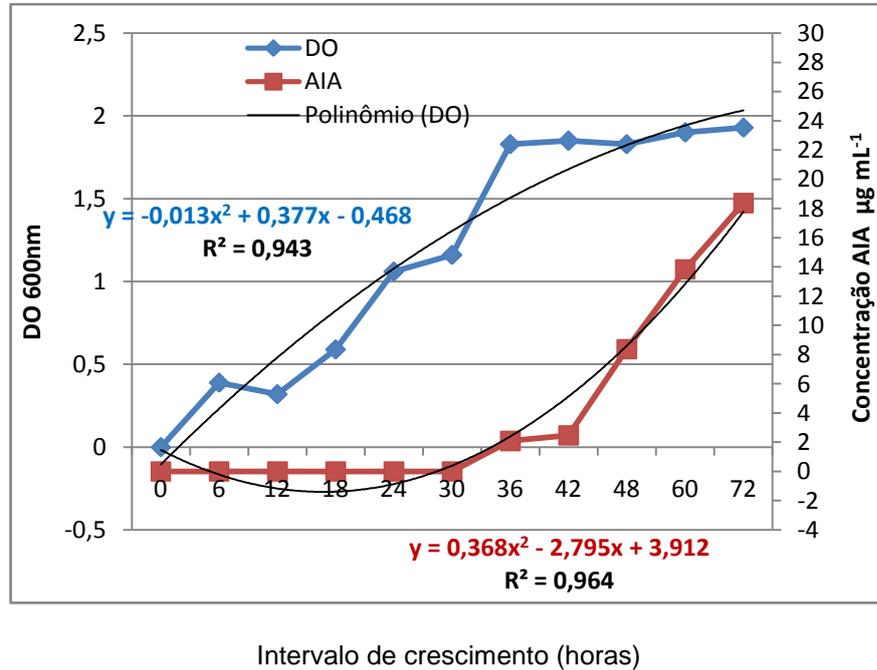
Figura 9 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado do isolado de *Myroides sp.*



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

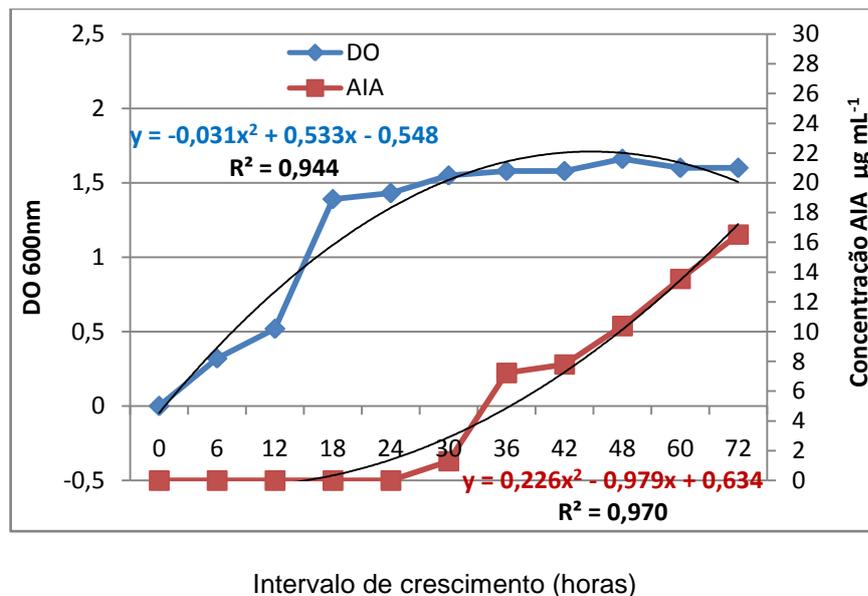
Figura 10 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de *Pseudomonas putida*.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

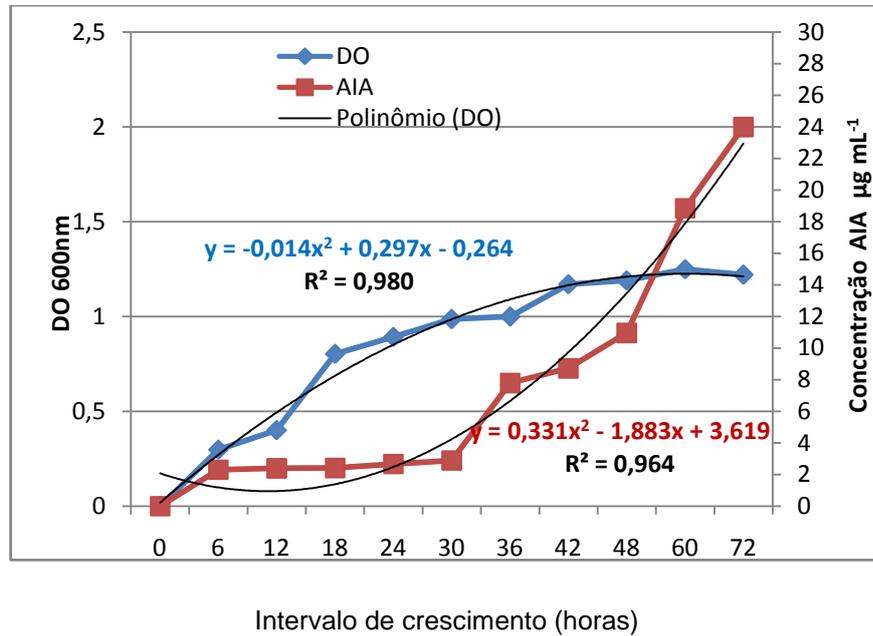
Figura 11 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de *Proteus vulgaris*.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

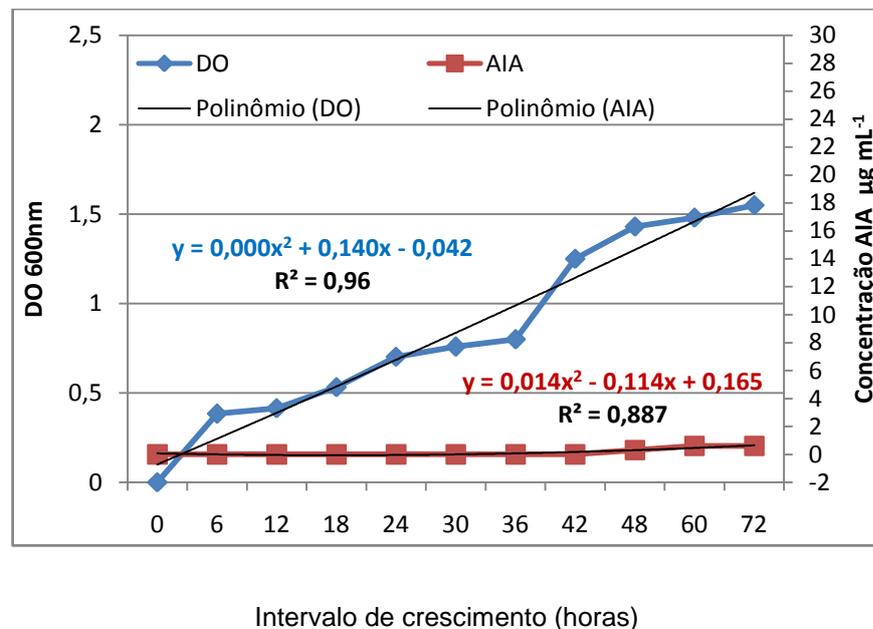
Figura 12 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de *Providencia* sp.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

Figura 13 – Dinâmica de crescimento e concentração da AIA do isolado de *Serratia* sp.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Os isolados foram cultivados em caldo nutriente suplementado com 200 µg/mL de triptofano, monitorados em intervalos de 6 horas crescimento: DO a 600 nm e concentração da AIA a 530 nm.

4.4 Antibiose por compostos voláteis

Os resultados obtidos indicam que todos os isolados testados neste trabalho produziram compostos voláteis. As Figuras 14-29 mostram, em percentuais, a capacidade antifúngica dos voláteis produzidos por cada bactéria. Pode-se observar que o isolado *Serratia* apresentou os melhores resultados de inibição de crescimento para todos os fitopatógenos testados, exceto para *Pythium* que não foi inibido por nenhum dos isolados. As maiores percentagens de inibição do crescimento micelial por *Serratia* sp foi obtida para *Colletotrichum* sp (tomate) e *Sclerotium* sp (fava) (67 e 67,25% respectivamente).

Apesar de haver um número significativo de pesquisas sobre a utilização de rizobactérias no controle de fungos fitopatogênicos, há poucos trabalhos sobre os compostos orgânicos voláteis antimicrobianos quando comparados ao antagonismo causado por substâncias difusíveis (CHAURASIA et al., 2005).

A diversidade de voláteis microbianos é extensa, ocorrendo em diferentes micro-organismos e em diferentes proporções, podendo pertencer a diversas classes químicas como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre. No entanto, com ação no controle biológico de doenças, a amônia e o ácido cianídrico (HCN) os mais importantes (WELLER, 1988; PAL et al., 2000). Os compostos voláteis podem reduzir ou até mesmo inibir a germinação de esporos de diversos fungos (CHUANKUN et al., 2004).

Vários autores têm demonstrado a eficiência de espécies de *Pseudomonas* em produzir níveis de HCN *in vitro* tóxicos a certos patógenos fúngicos, como *Thielaviopsis basicola* em tabaco por *P. fluorescens* (DOWLING; O'GARA, 1994). Wei, Kloepper e Tuzun (1991) verificaram que isolados de *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. aureofaciens* produziram HCN *in vitro* capazes de inibir o crescimento micelial de *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum orbiculare*.

No presente estudo os isolados de *Myroides* e *Serratia* foram mais efetivos para controlar o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (mandioca), *C. musae* (banana), *Colletotrichum* sp (tomate), *Colletotrichum* sp (fava), *Cercosporidium* sp (uruçu), *Curvularia* sp (cana-de-açúcar, *Sclerotium* sp (fava).

Vesperman, Kai e Piechulla (2007), também constataram inibição do crescimento micelial de vários fungos, dentre eles fitopatógenos importantes como *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* e espécies de *Penicillium*, por meio de voláteis produzido por espécies de *Serratia*.

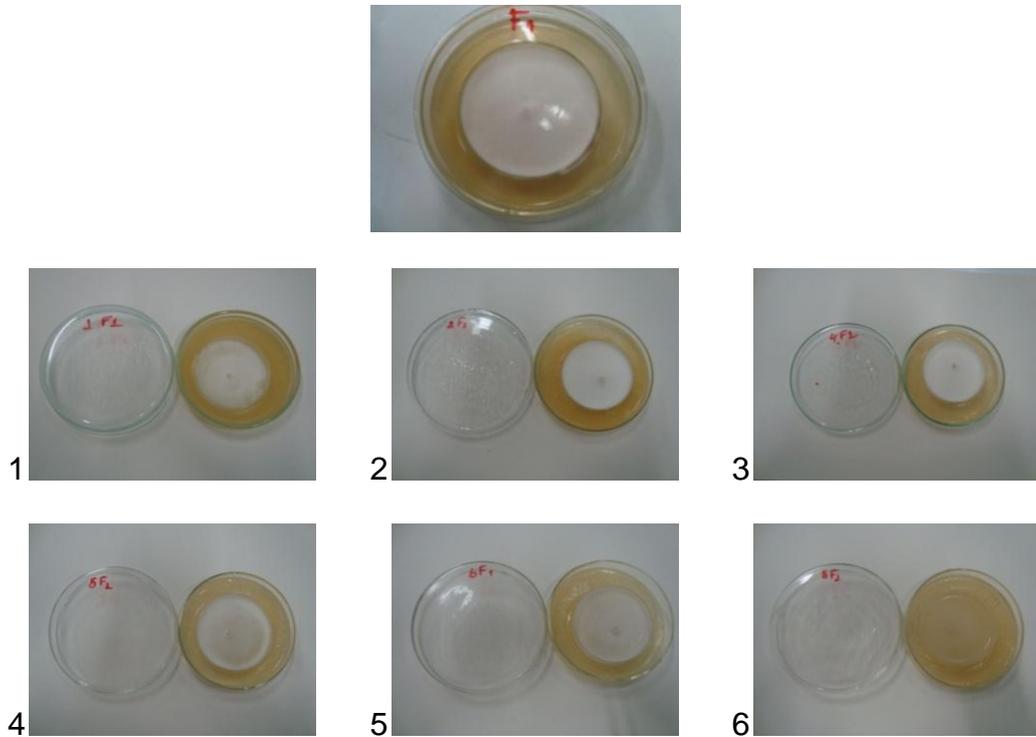
É provável que os voláteis atuem na alteração da expressão de proteínas (HUMPHRIS et al., 2002) e atividade de enzimas associadas a morfogênese (GRIFFITH et al., 1994; FIALHO et al., 2010), alteração no metabolismo oxidativo (FIALHO et al., 2010) e efeito sobre a membrana plasmática (INGRAM; BUTTKE, 1984; SEWARD, 1996).

Os compostos orgânicos voláteis são considerados “infoquímicos” ideais (WHEATLEY, 2002). Tem sido demonstrado que interações entre micro-organismos mediadas por voláteis podem ser positivas, negativas ou neutras, para um ou mais micro-organismos participantes da interação, podendo determinar vantagem seletiva para alguns membros da comunidade como também, podem ser utilizados no tratamento de frutos e vegetais e no controle de patógenos associados a sementes e na fumigação de solos contaminados (REZENDE et al., 2010).

O biocontrole pela introdução ou pelo manejo de bactérias antagônicas nos locais de colonização do patógeno é um processo econômico e compatível com a agricultura sustentável, não causando impactos no ambiente, nem efeitos tóxicos (ROBES, 1991). Como alternativa ao uso de agroquímicos, o controle biológico de fitopatógenos tem se apresentado como uma forma promissora e viável, por meio do uso de micro-organismos como agentes protetores de plantas cultivadas (MELO; VALARINI, 1995; PUNJA, 1997; BEVIVINO et al., 2000; KUNOH, 2002).

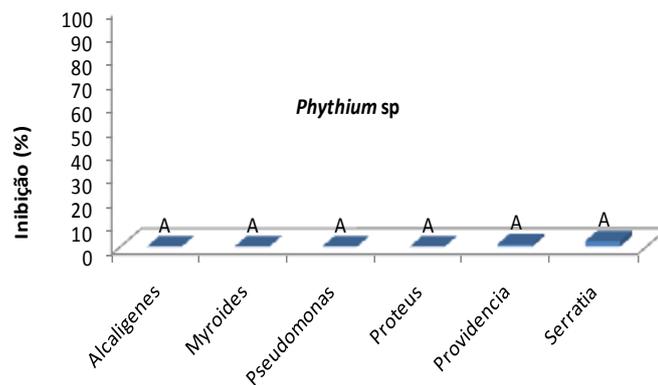
Figura 14 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Pythium* sp, pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha *Pythium* sp



Fonte: Autora, 2012.

Figura 15 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium* sp, pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

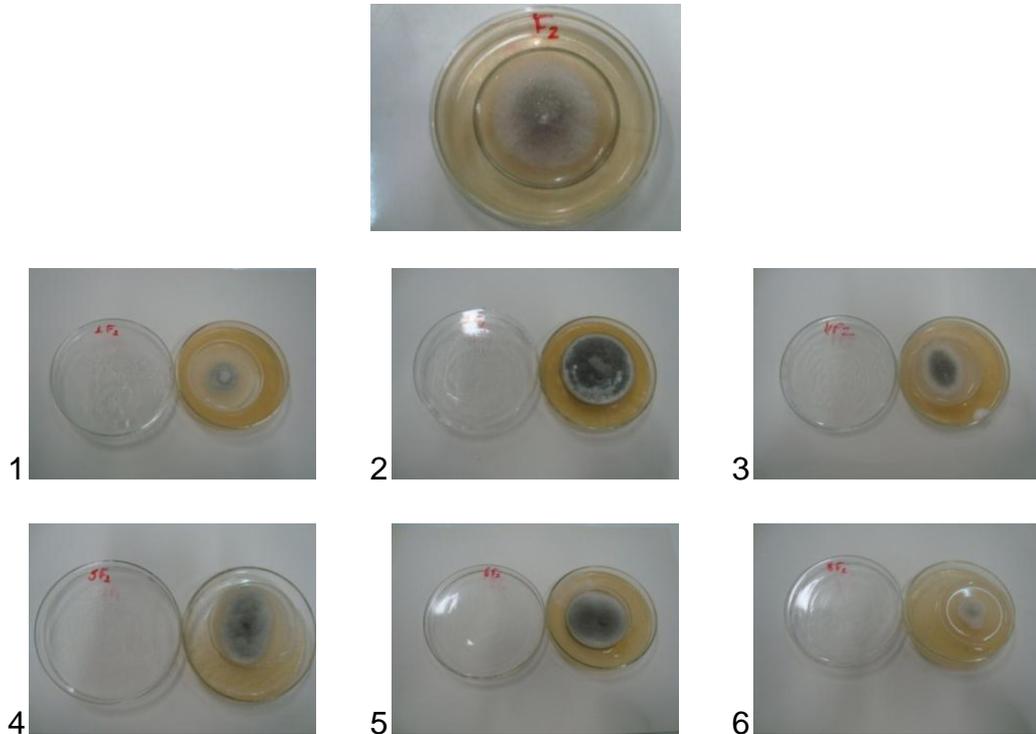


Fonte: Autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

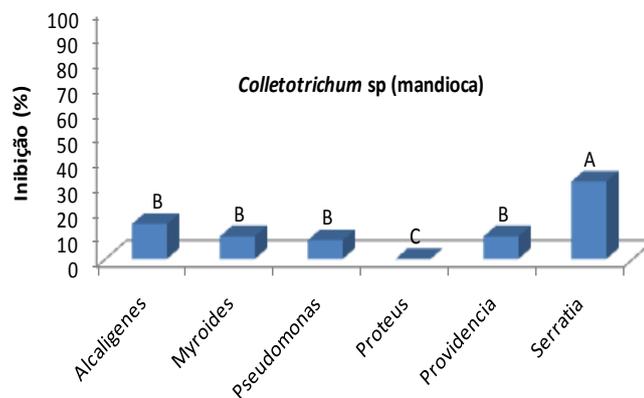
Figura 16 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (mandioca), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha *Colletotrichum* sp (mandioca)



Fonte: Autora, 2012.

Figura 17 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (mandioca), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

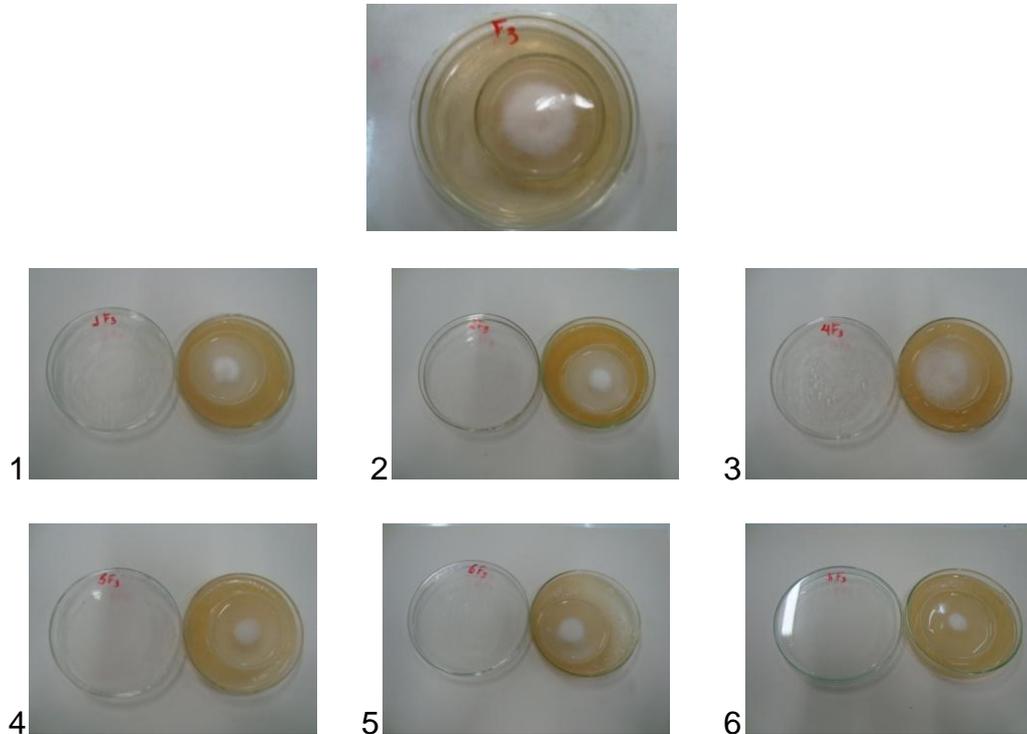


Fonte: Autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

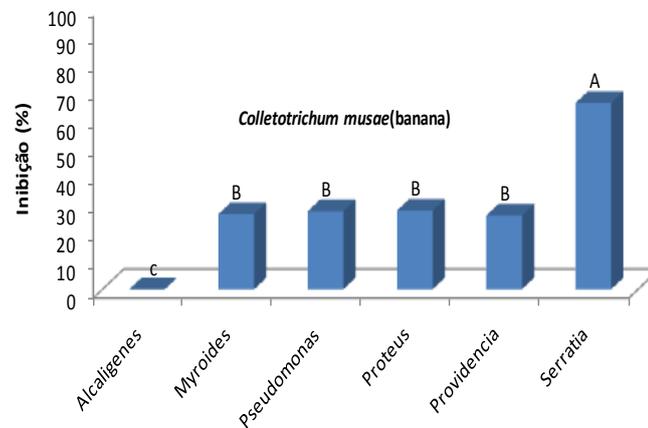
Figura 18 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Colletotrichum musae* (banana), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha *Colletotrichum musae* (banana).



Fonte: autora, 2012.

Figura 19 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum musae* (banana), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

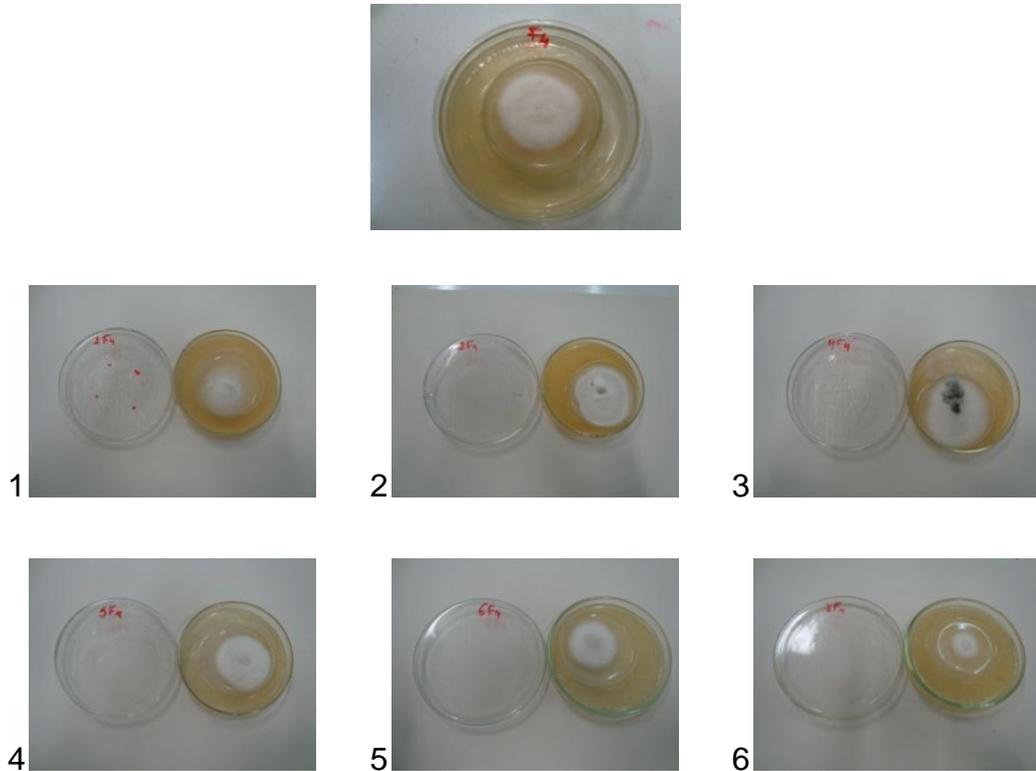


Fonte: autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

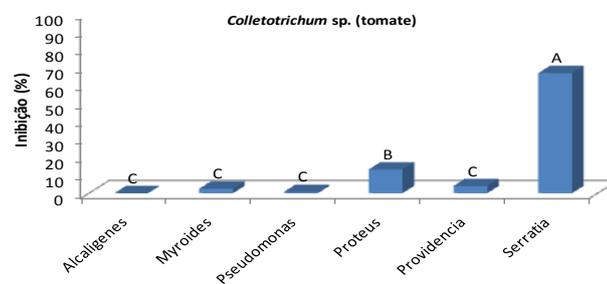
Figura 20 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (tomate), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha: *Colletotrichum* sp (tomate)



Fonte: autora, 2012.

Figura 21 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (tomate), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

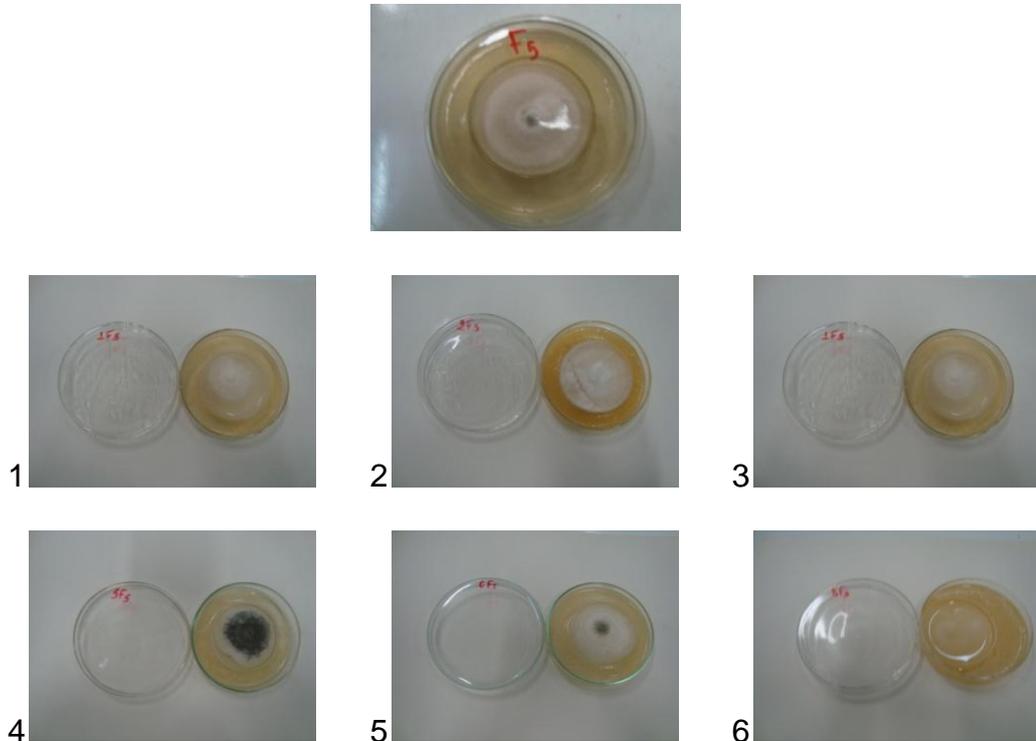


Fonte: autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

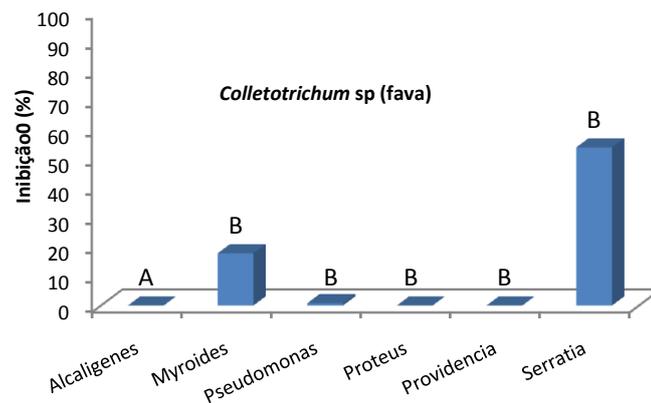
Figura 22 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (fava) pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha: *Colletotrichum* sp (fava)



Fonte: Autora, 2012.

Figura 23 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (fava), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

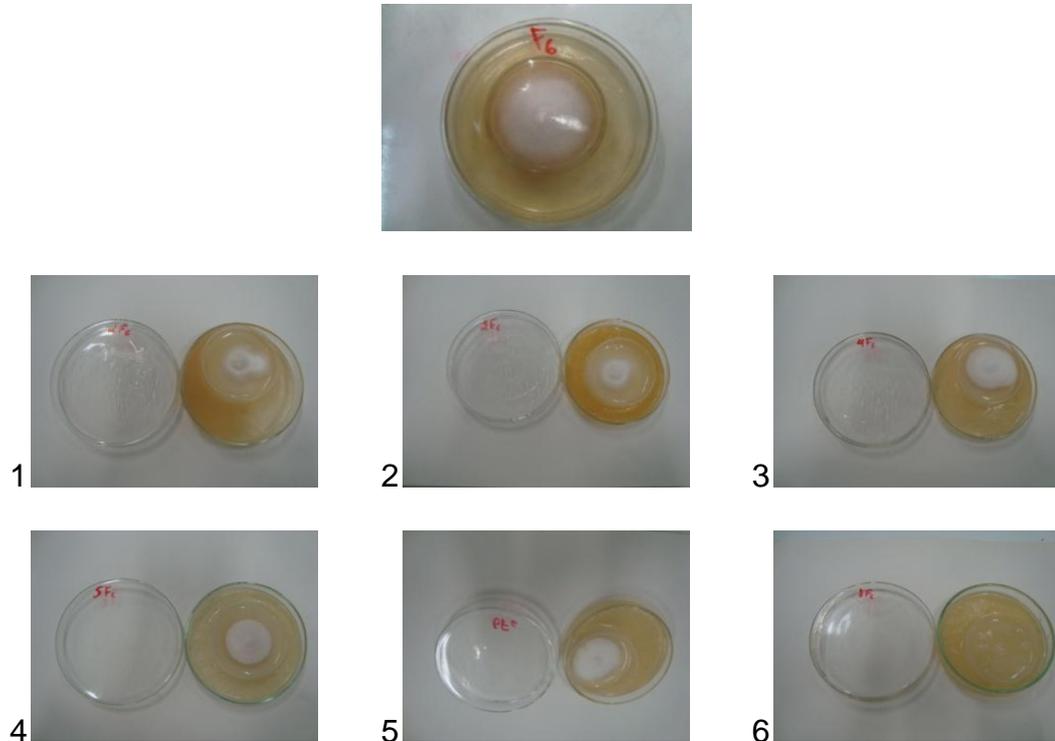


Fonte: Autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

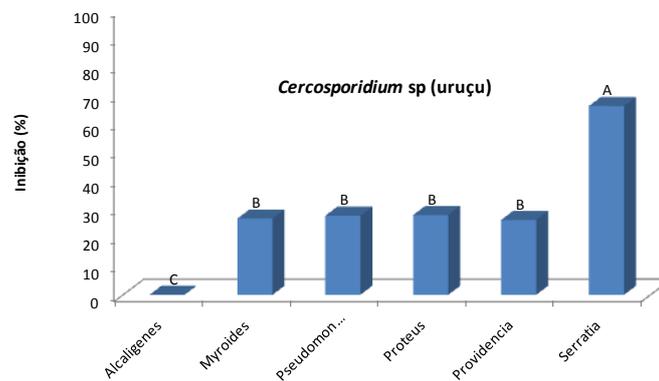
Figura 24 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Cercosporidium* sp (uruçu) pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha: *Cercosporidium* sp (uruçu)



Fonte: Autora, 2012.

Figura 25 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Cercosporidium* sp (uruçu), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

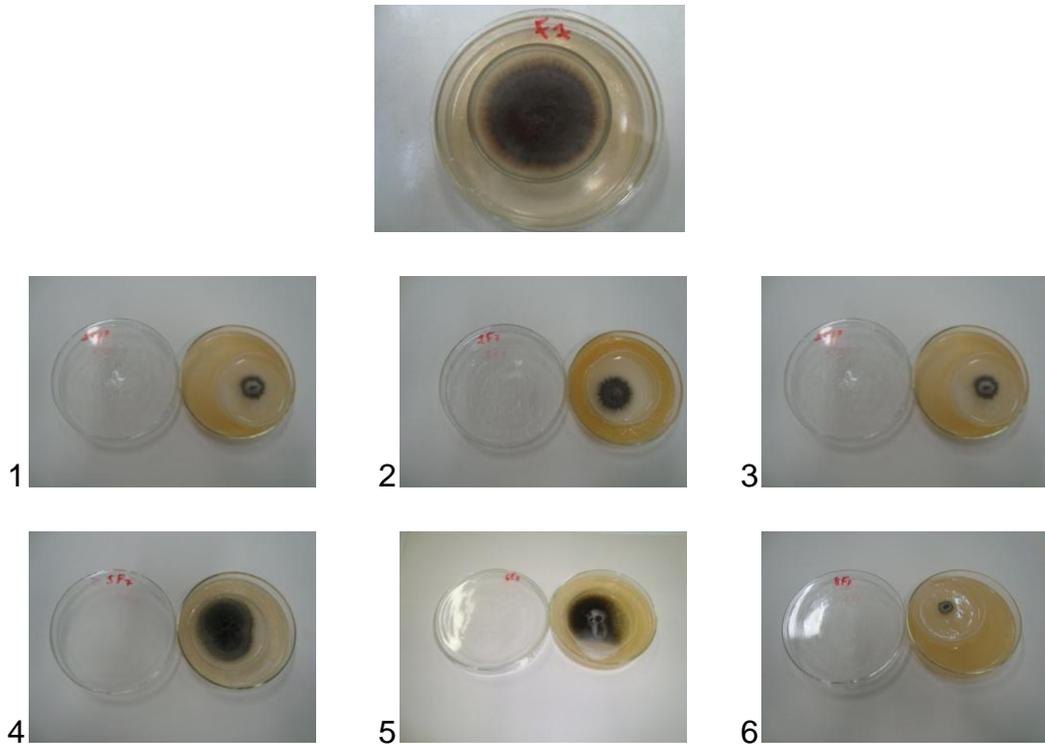


Fonte: Autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

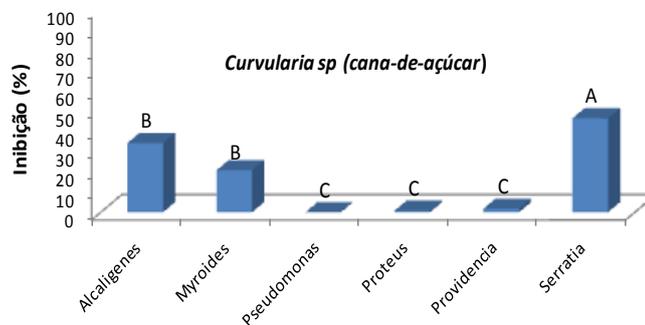
Figura 26 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Curvularia* sp (cana-de-açúcar) pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha: *Curvularia* sp (cana-de-açúcar)



Fonte: Autora, 2012.

Figura 27 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Curvularia* sp (cana-de-açúcar), pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.

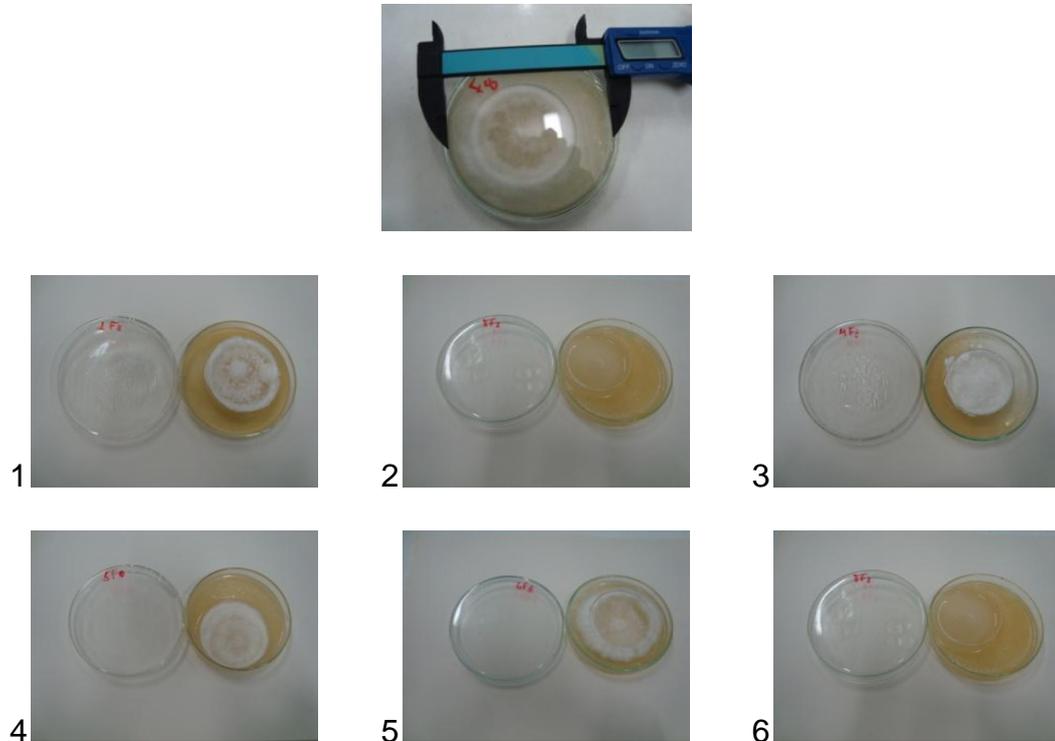


Fonte: Autora, 2012.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

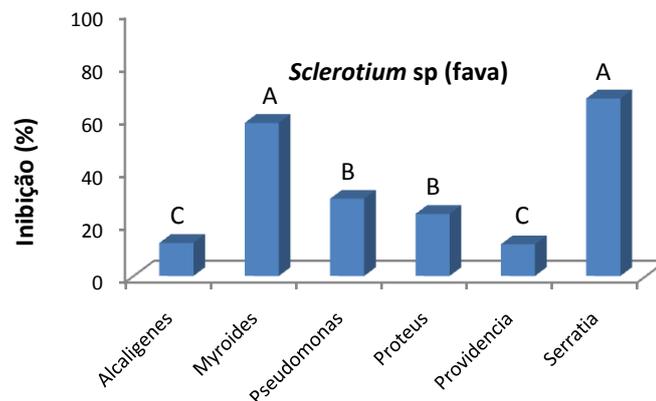
Figura 28 – Inibição “in vitro” do crescimento micelial de *Sclerotium* sp (fava) pelos isolados de *Alcaligenes faecalis* (1), *Myroides* sp (2), *Pseudomonas putida* (3), *Proteus vulgaris* (4), *Providencia* sp (5) e *Serratia* sp (6).

Fungo testemunha: *Sclerotium* sp (fava).



Fonte: Autora, 2012.

Figura 29 – Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Sclerotium* sp (fava) pelos isolados de *Alcaligenes faecalis*, *Myroides* sp, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp e *Serratia* sp.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: *Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott $P < 0,05$).

4.5 Solubilização de fosfato

Apenas os isolados de *P. putida* e *Providencia* halo em torno das colônias (13,5 e 8,8 mm respectivamente) indicando o potencial de solubilização de fosfato (Figura 30). Estes halos de solubilização foram superiores aos verificados por Silva Filho e Vidor (2000), Massenssini et al. (2008) e NautiyaL (1999), onde os diâmetros dos halos variaram de 2 a 7 mm para isolados do gênero *Pseudomonas* e de 2 a 5 mm para *Bacillus*.

Figura 30 – Halos de solubilização de fosfato inorgânico (CaHPO₄)₂ por isolados de *Pseudomonas putida* e *Providencia* sp cultivados em meio NYDA pH 7,0 a 28 °C por sete dias.



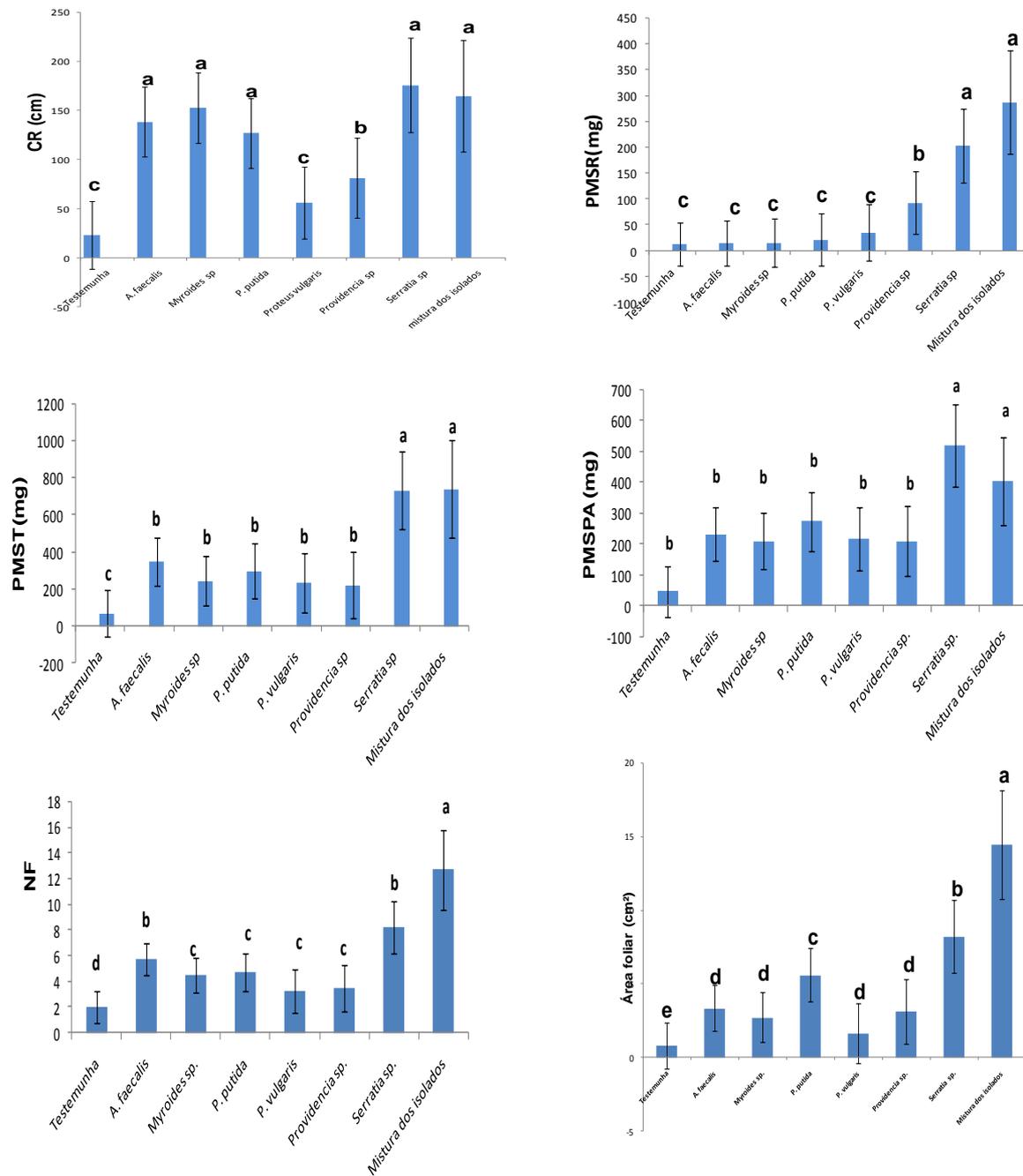
Fonte: Autora, 2012.

Esta habilidade tem sido atribuída à capacidade de alteração do pH do meio, através da liberação de ácidos orgânicos como citrato, lactato, succinato, dentre outros (HARIPRASAD; NIRANJANA, 2009), enquanto que para mineralização de fósforo orgânico, as fosfatases ácidas são de grande importância (SOUCHIE ET al., 2005).

Segundo Holford (1997) são documentadas 170 formas minerais de P inorgânico. No presente estudo se utilizou apenas uma das formas, o CaHPO₄. É possível que os outros isolados utilizem outras vias de solubilização.

4.6 Promoção de crescimento em mudas bacterizadas de tomate, pimentão e couve

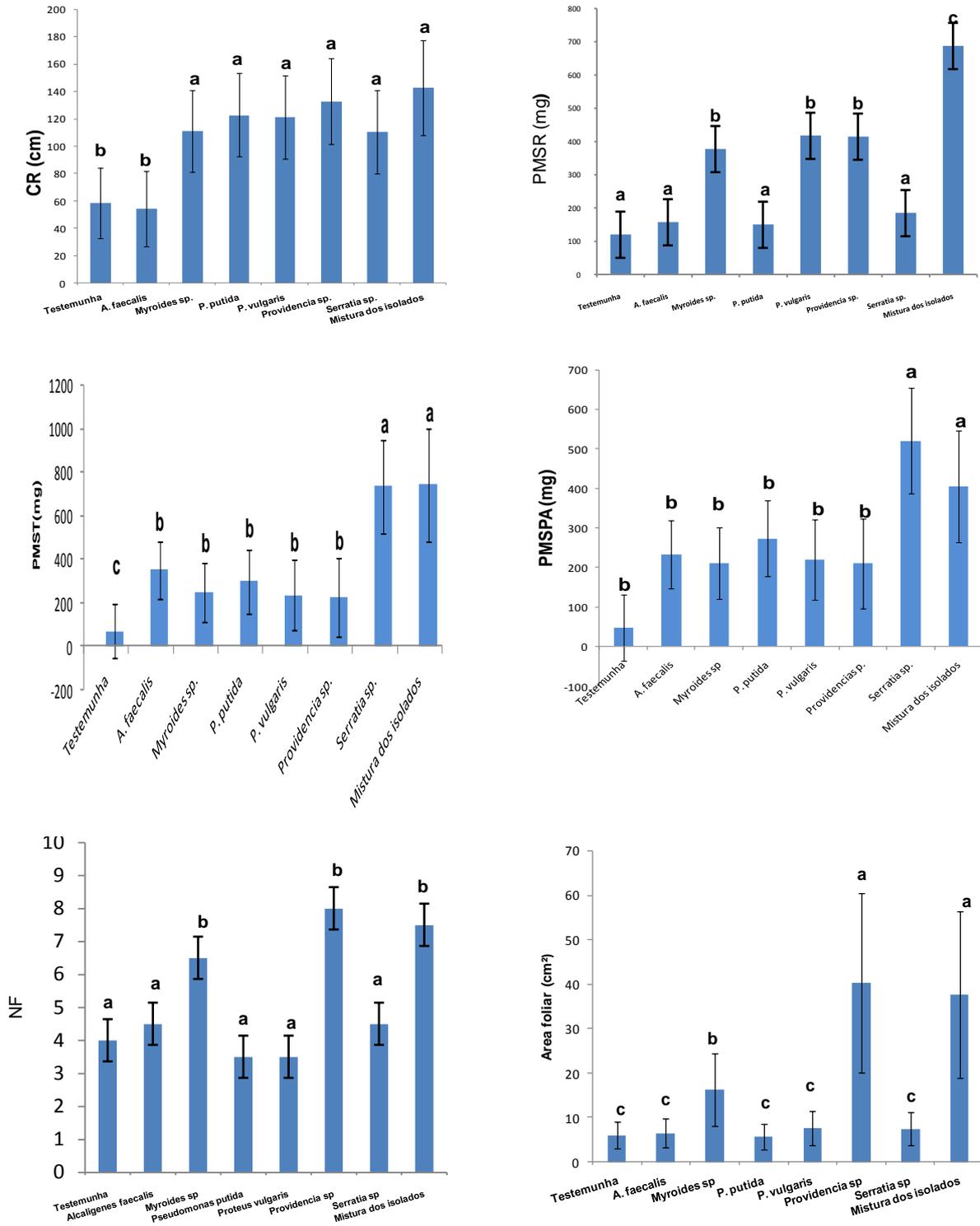
Figura 31 – Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de tomate.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

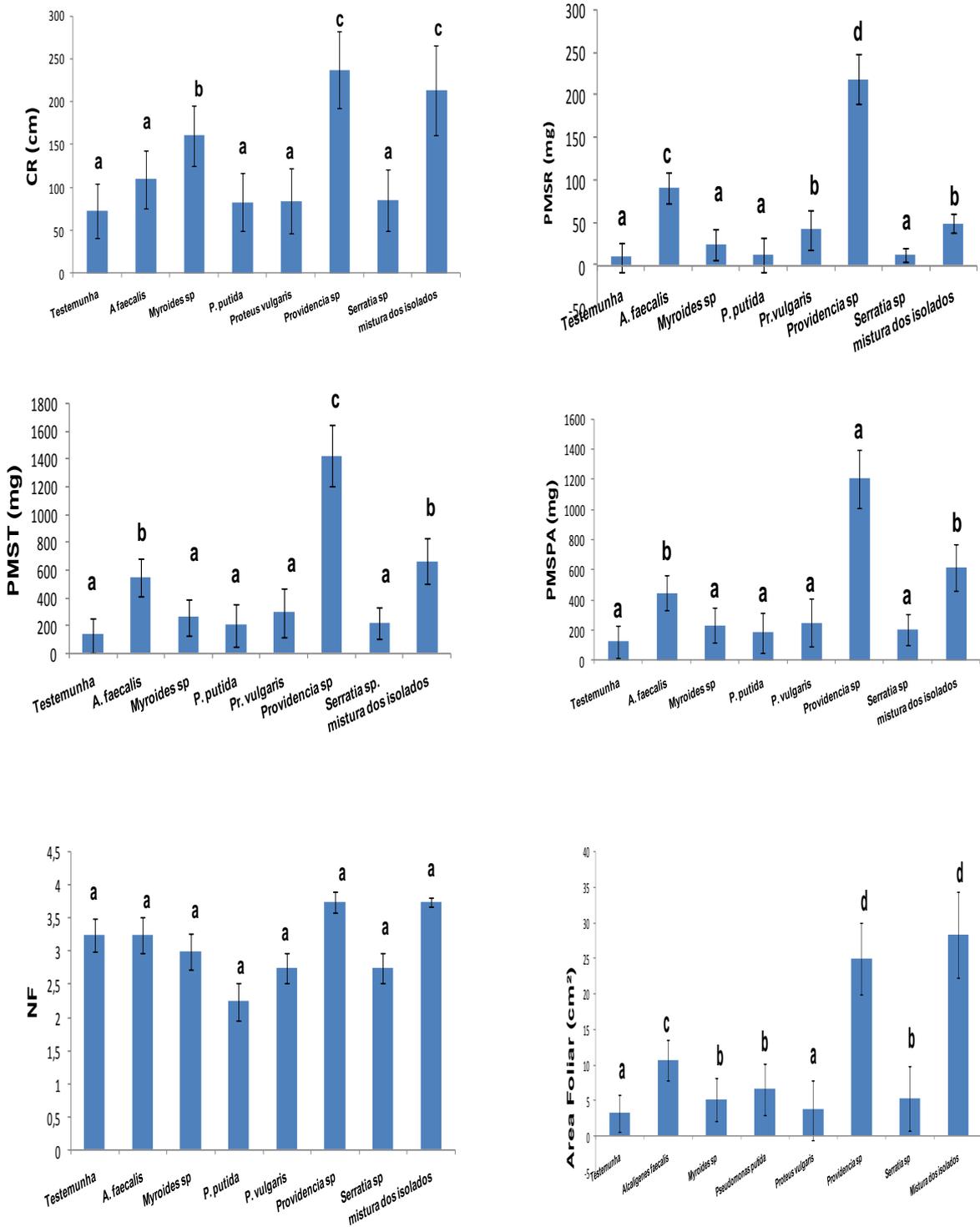
Figura 32 – Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de pimentão.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

Figura 33 – Médias de comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) peso de matéria seca total (PMST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de mudas bacterizadas de couve.



Fonte: Autora, 2013.

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

As análises de variância detectaram significância (teste F $p < 0,01$) entre os isolados bacterianos e hortaliças (tomate, pimentão e couve) e para interação entre os mesmos, para todas as variáveis: comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), de matéria seca da parte aérea (PMSPA), número de folhas (NF), área foliar (AF) e peso de matéria seca total (PMST).

Em relação às variáveis, comprimento de raiz (CR), peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e peso de matéria seca total (PMST) o teste Scott-Knott $P < 0,05$) identificou diferenças significativas entre todas as bactérias e a testemunha.

Para CR, a mistura dos isolados apresentou maior média, individualmente, *Myroides*, *Providencia* e *Serratia* proporcionaram as maiores médias não diferindo significativamente entre si.

Para PMSPA o isolado de *Providencia* e a mistura dos isolados não diferiram estatisticamente entre si apresentando os melhores resultados. Os isolados de *Proteus* e *Pseudomonas* diferiram significativamente dos isolados de *Alcaligenes*, *Myroides* e *Serratia* proporcionando os menores valores.

Providencia e a mistura dos isolados apresentaram os melhores resultados não diferindo significativamente entre si para PMST. O teste Scott-Knott $P < 0,05$) não identificou diferenças significativas entre os demais isolados.

O isolado de *Pseudomonas* não diferiu significativamente da testemunha, para as variáveis PMSR, NF e AF. Em relação a PMSR e NF os melhores resultados foram proporcionados pela mistura dos isolados, seguido de *Providencia*, os demais isolados não diferiram entre si. Para NF a maior média foi obtida para a mistura dos isolados, enquanto *Proteus* e *Pseudomonas* não diferiram da testemunha.

Na análise dos desdobramentos das interações, o teste Scott-Knott $P < 0,05$) identificou melhores resultados proporcionado pelo isolado de *Serratia*, em relação ao tomate, exceto para CR que apesar de apresentar maior média, não diferiu significativamente de *Alcaligenes*, *Myroides* e *Pseudomonas* (Figura 31). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Barreti et al. (2009), que estudando isolados de *Acinetobacter johnsonii*, *Sinorhizobium* sp *Bacillus*

megaterium, e *Serratia marcescens* quanto à sua potencialidade como agentes de biocontrole de doenças e promoção de crescimento do tomateiro verificaram que apenas *Serratia* foi capaz de promover crescimento.

Outra interação que se destacou foi entre *Providencia* e couve promovendo os maiores aumentos que diferiram estatisticamente dos outros tratamentos e a mistura dos isolados para as variáveis: PMSR, PMSPA e PMST (Figura 33). Para as outras variáveis o tratamento com o isolado não resultou em diferenças significativas em relação à mistura dos isolados.

Quanto ao pimentão, o isolado de *Myroides*, *Proteus*, *Providencia* proporcionaram os maiores aumentos de PMSR (377.50, 417.50 e 415.00 mg respectivamente) (Figura 32), o tratamento com *Myroides* resultou em maiores PMSPA, PMST (581.5, 959.00 mg, respectivamente) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, quanto ao NF (8.00) e AR (40.26cm²) esse efeito foi obtido com *Providencia*. No entanto, na média de todos os tratamentos, produziu os melhores resultados.

Além do aumento da massa seca, a arquitetura do sistema radicular das plantas inoculadas foi diferente das plantas controle. As plantas inoculadas apresentaram sistema radicular mais alargado que as plantas controle, em hortaliças é interessante que as raízes se espalhem mais horizontalmente, pois os canteiros são pouco profundos e os nutrientes oriundos da adubação tendem a se concentrar nos primeiros 10 a 15 cm do solo.

Silveira et al. (1995) obtiveram resultados semelhantes quando plantas de feijão receberam isolados de *Pseudomonas* sp. Chiarini et al. (1998), por sua vez, obtiveram aumentos significativos tanto na massa da matéria fresca da parte aérea como da raiz quando plantas de sorgo receberam inóculo contendo isolados de *Pseudomonas fluorescens* ou de *Burkholderia cepacia*. Gasoni et al. (2001) obtiveram respostas positivas apenas em relação à massa da matéria fresca em plantas de alface

Para todos os tratamentos a mistura dos isolados produziu os melhores resultados, conforme evidenciado nas Figuras. Em experimento em casa de

vegetação, Siddiqui e Shaukat (2002) inocularam um consórcio de rizobactérias em tomateiros e constataram aumento da massa de matéria fresca da parte aérea nas plantas que receberam o inóculo, em comparação ao controle.

Em experimento com mudas de abacaxi, Mello et al. (2002) inocularam diferentes consórcios de bactérias e obtiveram diferença significativa em relação à massa de matéria seca da parte aérea.

Os resultados indicam que os isolados testados podem ser considerados RPCP, pois apresentaram efeito positivo para pelo menos uma das características testadas. Esses resultados também indicam que os isolados interferiram em algum estágio de desenvolvimento da planta, podendo ser a interação entre genótipo da planta e a bactéria, adaptação às condições ambientais, tipo de solo, pH entre outros fatores.

A capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada pelas rizobactérias tem sido atribuída a vários mecanismos, dentre eles, indiretamente, pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos.

A produção de AIA pode desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, e no processo de enraizamento induzindo o aumento no crescimento das raízes e na parte aérea, no número de folhas, na área foliar e no rendimento. Segundo Harthmann (2010) o aumento no volume das raízes é devido ao efeito da microbiolização de rizobactérias nas sementes provavelmente permite maior absorção de água e nutrientes pela planta e, como consequência, incremento no desenvolvimento de plantas.

Após inoculação da planta com algumas rizobactérias promotoras de crescimento, podem ocorrer dois efeitos relacionados a auxina: o primeiro e direto, devido a produção do AIA pelos micro-organismos na rizosfera; o outro devido ao estímulo a síntese desse hormônio pela própria planta (GAUDIN; VRAIN; JOUANIN,

1994). O ácido 3-indol acético (AIA) a auxina mais comumente produzida na natureza, e sintetizada principalmente em rotas bioquímicas dependentes do triptofano. Bactérias promotoras de crescimento de plantas são favorecidas indiretamente, pois dependem dos metabólitos liberados por seus hospedeiros na rizosfera, assim, a produção de fitormônios por bactérias pode aumentar a quantidade de produtos exsudatos e a área de exsudação da planta (GLICK et al., 1999).

Os resultados são semelhantes àqueles obtidos por vários autores, com várias culturas e vários gêneros como *Azospirillum* spp, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella* sp, *Bacillus* e *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Xanthomonas* sp, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium* spp e *Bradyrhizobium* spp e *Serratia* sp sendo as pseudomonas o grupo mais estudado.

As interações observadas indicam que isolados de rizobactérias que colonizam uma determinada espécie vegetal em maior nível, podem não ser os melhores colonizadores de outra espécie. Segundo Miller; Henken e Van Veen (1989), essas diferenças acontecem devido às quantidades e composições dos exsudatos radiculares que devem variar de uma espécie para outra e mesmo de uma cultivar para outra na mesma espécie, e independentemente do solo, produza alguma substância que favorecem determinadas rizobactérias.

O crescimento vegetal também pode ser estimulado de forma mais direta, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas, pela solubilização de fosfato inorgânico e pela mineralização de fosfato orgânico. Diferentes gêneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Agrobacterium*, possuem habilidade para solubilizar fosfatos de compostos inorgânicos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Chabot, Antoun e Cescas (1996 a) e Chabot et al. (1996 b) testaram microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp e *Rhizobium leguminosarum*, para verificar seu potencial como RPCP em alface e milho. A solubilização de fosfato por essas bactérias pareceu ser um mecanismo importante para a promoção de crescimento da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, por causa do aumento da disponibilidade do nutriente.

Os microrganismos afetam diretamente a habilidade das plantas em adquirirem P do solo por meio de vários mecanismos. Esses mecanismos incluem: incremento da área superficial das raízes pela extensão do sistema radicular ou pela promoção do crescimento de raízes laterais e pelos radiculares (promoção de crescimento por meio de fitormônios); deslocamento do equilíbrio de adsorção, o que resulta numa transferência de íons fosfato para a solução do solo ou incrementa a mobilidade de formas orgânicas de P e estímulos de processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico e orgânico. Esses processos incluem a excreção de íons hidrogênio, liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e a produção de enzimas fosfatases que são capazes de hidrolizar o P orgânico.

No Brasil, existem diversos trabalhos que mostram o efeito benéfico de rizobactérias e outros micro-organismos que, além de atuarem como promotores de crescimento de plantas, também exercem antagonismo a diversos patógenos. Em estudo realizado por Gomes et al. (2003), foi observado que mudas de alface tratadas com isolados de *Bacillus* spp. obtiveram maior massa quando comparadas às não tratadas.

Também com alface, Freitas et al. (2003), conseguiram maior desenvolvimento de plantas tratadas com isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Bettiol, Garibaldi e Migheli (1997) realizaram aplicações de um produto na forma de pó-molhável e metabólitos concentrados produzidos por *Bacillus subtilis* na parte aérea plantas de pepino e abóbora para controlar lesões provocadas por oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). Os autores verificaram que a pulverização de produtos formulados à base do antagonista resultou em maior massa de matéria fresca das plantas, quando comparadas à testemunha pulverizada apenas com água. Além disso, observaram que as folhas foram pulverizadas com os concentrados produzidos à base do antagonista, não apresentaram lesões causadas pelo patógeno.

O benefício de rizobactérias sobre o crescimento de plantas também pode ser observado em outras culturas além de hortaliças. Freitas e Vildoso (2004) avaliaram a eficiência de rizobactérias quanto à promoção de crescimento de diferentes porta-

enxertos de plantas cítricas e verificaram que alguns isolados promoveram o crescimento das raízes das plantas cítricas.

Da Silva (2005), observou por meio do estudo de promoção de crescimento em mudas de cacaueteiro, os efeitos positivos quanto a capacidade de produção de AIA e solubilização de fósforo detectados em *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp e *Enterobacter* sp, Bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, a capacidade de mineralização de nutrientes e produção de sideróforos ou solubilização de fósforo e produção de auxinas, são desejáveis para uma possível aplicação no campo, proporcionando o aumento da produção agrícola (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

Amorim e Melo (2002), também avaliaram em plantas de citros o antagonismo de isolados de *Pseudomonas* spp e *Bacillus* spp a *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*. Os resultados obtidos *in vitro* mostraram um possível antagonismo tanto pela produção de sideróforos como pela produção de substâncias tóxicas e nos testes *in vivo* os isolados reduziram a infecção causada pelos dois isolados do patógeno.

5 CONCLUSÕES

- As informações obtidas por meio dos testes bioquímicos permitiram que os isolados fossem identificadas como *Alcaligenes faecalis* ssp *faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettigueri*, *Serratia marcescense* *Myroides* sp, enquanto que por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S, *Providencia rettigueri*, *Serratia marcescens* e *Myroides* sp não permitiram que fossem identificadas em espécie devido os primers universais utilizados produzirem um fragmento de aproximadamente 500 pb, o que corresponde apenas a 1/3 da sequência completa que é de aproximadamente 1.500 pb.
- Os isolados de *A. faecalis* ssp *faecalis*, *Myroides* sp, *P. putida*, *P. vulgaris* e *Providencia* sp produzem AIA em maior quantidade.
- Os isolados de *Pseudomonas putida* e *Providencia* sp foram capazes de solubilizar fosfato.
- O isolado de *Serratia* sp apresenta maior eficiência no controle dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* sp e *Sclerotium* sp por compostos voláteis.
- Os experimentos em casa de vegetação mostraram que as rizobactérias interferiram positivamente no desenvolvimento de mudas de couve, pimentão e tomate, destacando-se a mistura dos isolados em todas as variáveis; o isolado de *Providencia* sp se destacou para as variáveis: CR, PMSR, PMSPA, NF e AF; o isolado de *Serratia marcescens* se mostrou mais eficiente no incremento de PMST.
- Este é o primeiro relato de *Myroides* sp como rizobactéria promotora de crescimento e produtora de AIA e de *Providencia* sp como solubilizadora de fosfato.
- Para as variáveis onde o incremento ao crescimento não ocorreu, não se observou depleção.
- As rizobactérias estudadas demonstraram que possuem potencial para serem empregadas no desenvolvimento de novos produtos para promoção do crescimento de plantas e no controle de fungos fitopatogênicos por compostos voláteis.

REFERÊNCIAS

ADESEMOYE A. O; TORBERT H. A, KLOEPPER J. W., Plant growth-promoting Rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58 (Suppl 4), p. 921-929, 2009.

ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W., Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 85, No. 1. pp. 1-12, 2009.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S., Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turk J Biol**, v. 29, pp. 29-34, 2005.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S., Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbial Research**, v. 163 (Suppl 2), p. 173-81, 2008.

AHMAD; N. et al., Molecular characterization of bacterial population in the forest soil of Kashmir, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.107–113, 2009.

AKHTAR, S.; ALI, B., Evaluation of rhizobacteria as non-rhizobial inoculans for mung beans. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n.13, p.1723-1729, 2011.

ALMENAR; E. et al., Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2240–2245, 2007.

ALTSCHUL; S. F. et al., Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, nº. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, B. R. J.; DODDEY, R. M.; URGUIAGA, S., The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p.1-9, 2003.

AMBROSINI; A. et al., Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) **Plant Soil**, v. 356, p. 245–264, 2012.

AMORIM, E. P. DA R.; MELO, I. S. DE, Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthorae* seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, nº. 2, p. 565-568, 2002.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M., Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

ARAUJO, F. F; HUNGRIA, M., Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/ *B. elkanii*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643, 1999.

ARKHIPOVA; T. N. et al., Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v. 272, p. 201–209, 2005.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T., Microbial production of plant hormones **Plant and Soil**, v. 133 (Suppl 1), p. 1-8, 1991.

ASGHAR; H. N. et al., Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea*L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231- 237, 2002.

ASHRAFUZZAMAN; M. et al., Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1247-1252, 2009.

ASLANZADEH, J., Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. In: TANG, Y.; STRATTON, C., W. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. New York: **Springer US**, p. 84-116. disponível em: Springer-Link Protocols – www.springerlink.com. 2006.

AUSUBEL; F. M. et al., *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Association; **Wiley-Interscience**, v. 1, 1992.

AVIS; T. J. et al., Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, **Elmsford**, v. 40, n. 7, p. 1733–1740, 2008.

BABALOLA, O. O., Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters**, v. 32 (11), p. 1559-70, 2010.

BAKKER, P. A. H. M. et al., New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research - Foreword. **Eur. J. Plant Pathol**, v. 119, p. 241-242, 2007.

BANNANTE, C. A., Economic evaluation of the use of phosphate fertilizers as a capital investment. In: A.E. JOHNSTON A. E.; J.K. SYERS (eds.). Nutrient management for sustainable crop protection in Asia. **CAB International, Wallingford, UK**, 1998.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J., Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2397- 2406, 1999.

BARBER S. A., Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach, 2.ed. **New York, Wiley**, 414 p., 1995.

BARRETTI, P. B. et al., Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 33, p. 2038-2044, 2009.

BEIJERINCK, M. W., Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. Reprint from: **Phytopathology Classics, Number 7**. 1942. James Johnson, translator, APS Press, 1898.

BEIJERINCK, M. W.; VAN DELDEN, A., Tiber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II**, v. 9, p. 3-43, 1902.

BENEDUZI, A., PASSAGLIA, L. M. P., Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting Bacilli, in Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses, Dinesh K. Maheshwari (Ed), **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. USA. Pp.1-14, 2011.

BETTIOL, W., Capítulo 1 - Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: **Embrapa-CNPDA**, p. 01-05, 1991.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q., *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, Campinas, v. 2, n. 56, p. 281-287, 1997.

BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B., Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 341 p., 2009.

BEVIVINO, A. et al., Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225–231, 2000.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J., Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.

BOONE, D. R. et al., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1, 2d ed. New York, **Springer**, 2001.

BOSSHARD, P. P., et al., 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of non fermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1359–1366, 2006.

BOSSHARD, P. P. et al., Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation) **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(9), p. 4134-40, 2003.

BOTELHO, G. R. et al., Importância de antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças de plantas. Documentos, Seropédica, **Embrapa Agrobiologia**, v. 211, 31 p. 2006.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, p.1-102, 1999.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Oficina sobre fertilizantes no Brasil**. Brasília. Contrato Ministério de Ciência e Tecnologia e Centro de Estudos Estratégicos MCT/FSAGCGEE/ Consultoria No 056/2009.

- BROEK, A. V. et al., Auxins upregulate expression of indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.
- BRUNETTA, et al., Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de diferentes espécies de Pinus sp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1027 -1033, 2007.
- BUCHENAUER, H., Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases e Protection**, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.
- BURKHOLDER, W., Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-118, 1950.
- BUSH, U.; NITSCHKO, H., "Methods for the differentiation of microorganisms," **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.
- BYRNE, J. M. et al., Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control**, v. 32, p. 408-418, 2005 .
- CABALLERO-MELLADO, J., Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latino americana de Microbiología**, México, v. 48, n. 2, p. 154-161, 2006.
- ÇAKMAKÇI, R. et al., Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biol Biochem**, v. 38, p. 1482–1487, 2006.
- CAMPOS SILVA, J. R. et al., Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1062-1072, 2008.
- CANHOS, V. P. et al., Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C.A.; BICUDO, C. E. M. (1997). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1. Microorganismos São Paulo: **FAPESP**, v. 1, p. 1-13, 1997.
- CAO, B. et al., 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions in four *Proteus* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, p. 109-118, 2009.

CARDOSO, E. J. B. N. et al., PGPR in Coniferous Trees. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiological Crop Ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, chap. 12 p. 345 – 369, 2011.

CARTIEAUX, F. et al., Transcriptome analysis of Arabidopsis colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. **Plant J.**, v. 36, p. 177–188, 2003.

CARVALHO, D. D. C. et al., Rizobactérias Produtoras de Promotores do Crescimento de Plantas **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, nº. 4, pp. 338-341, 2009.

CARVALHO, F. C. Q. et al., Métodos de Bacterização e Promoção de Crescimento em Melancia com Utilização de Bactérias Epifíticas **Revista Brasileira de Agroecologia/nov.** v. 4 No. 2, 2009.

CASSA'NA, F. et al., *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L) and soybean (*Glycine max* L). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 28–35, 2009.

CATTELAN, A. J., Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Londrina: Embrapa Soja**, 36 p., 1999.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal, Madison**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CHABOT, R.; ANTOUN H, CESCAS, M. P., Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. **Plant Soil**, v. 184, p. 311 – 321, 1996 a.

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

CHABOT, R. et al., Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2767-2772, 1996 b.

CHANDLER, J. W., Local auxin production: a small contribution to a big field. **BioEssays**, v. 31, p. 60-70, 2009 b.

CHAURASIA, B. et al., Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research, Amsterdam**, v. 160, p. 75-81, 2005.

CHEN, H. et al., Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 919–923, 2008.

CHEN, Y. P, et al., Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Appl Soil Ecol** , v. 34, p. 33-41, 2006.

CHIARINI, L. et al., Influence of plant development cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, v. 8, p.11-18, 1998.

CHIARINI, L. et al., Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. On *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 81-87, 1997 .

CHUANKUN, X. et al., Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology and Biochemistry, Yunnan**, v. 36, p. 1997-2004, jul. 2004.

CLARK, E. et al., Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola*, pathovar *gypsophilae*. **Phytopathology**, v. 83, p. 234–240, 1993.

COHN, F., Untersuchungen über Bakterien. **Beitraege zur Biologie der Pflanzen**. V. 1, p. 127-244, 1872.

COLEMAN, D., CROSSLEY JR., D., HENDRIX, P., **Fundamentals of Soil Ecology**, 2^a ed. Elsevier, Academic Press, New York, 2004.

CONN, H. J., Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 353-360, 1942.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W., Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: Bettiol, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 224-237, 2009.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J., Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetic**, v. 243, p. 463–472, 1994.

CUBETA, M. A.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B., Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Disease, St. Paul**, v. 69, p. 506-509, 1985.

CURL, E. A.; TRUELOVE, B., Root exudation. The Rhizosphere. (Advanced Series in Agricultural Sciences, Vol. 15), **Springer-Verlag**, 288 p., p. 52-54, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1986.

DA LUZ, W. C., Microbiological control of *Biopolaris sorokiniana* *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 246-247, 1990.

DA SILVA, A. C. M., **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. 78f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2005.

DARWIN, C.; DARWIN, F., The Power of Movement in Plants. John Murray, **London**, 1880.

DASTAGER, S. G.; DEEPA, C. K.; PANDEY, A., Potential, plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 259-265, 2011.

DAWSON, C. J.; HILTON, J., Fertilizer availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. **Food Policy**, v. 36, S14-S22, 2011.

DE ARAÚJO, F. F.; DE CARVALHO, M. H. M., *growth of tomato* after treatment of plants with *Bacillus subtilis* and carbofuran; **Journal of Bioscience**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 59-64, July/Aug., 2009.

DE QUEIROZ, B. P. V.; MELO, I. S., Antagonismo de *Serratia marcescens* toward *Phytophthora parasítica* and its effects in promoting the growth of citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 448-450, 2006.

DELMAS, J., et al., Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* sp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 311- 313, 2008.

DIAS, A. et al., Levantamento e caracterização morfo-cultural de rizobactérias isoladas a partir de hortaliças cultivadas em sistema orgânico de produção. Seropédica: **Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 50; EMBRAPA agrobiologia**. 20 p. 2009.

DÍAZ ALCÁNTARA, C. et al., Estudio de viabilidad de la biofertilización del cultivo de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en República Dominicana, con cepas de rizobios autóctonos, seleccionados en agrosistemas de montaña. XXIV Reunion Latino Americana De Rhizobiologia (XXIV Relar) y **I Conferencia Iberoamericana De Interacciones Beneficiosas Microorganismo-Planta-Ambiente** (I IBEMPA). 2009.

DOBBELAERE, S. et al., Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, p. 155–164, 1999.

DOWLING, D. N.; O'GARA, F., Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends Biotechnol.** v. 12, p. 133-141, 1994.

DRANCOURT, M. et al., 16S ribosomal sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623–3630, 2000.

EGAMBERDIYEVA, D., The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36 (Suppl 2-3), p. 184–189, 2007.

EGAMBERDIYEVA, D.; HÖFLICH, G., Influence of Growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 973-978, 2003.

ETESAMI, H. et al., Effect of superior IAA producing rhizobion on N, P, K uptake by Wheat grown under greenhouse condition. **World Journal of Applied Sciences**, v. 6 (Suppl 12), p. 1629-1633, 2009.

FARBER, J. M. et al., Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, H. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington D. C.: American **Public Health Association**, chap. 11, p. 127-156, 2001.

FARIAS, M. A. A. et al., Potencial antagônico de *Streptomyces* sp. no controle de fitopatógenos. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 124-129, 2009.

FARINA, R. et al., Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

FARZANA, Y.; RADIZAH, O., Influence of rhizobacterial inoculation on growth of the sweet potato cultivar. **On Line Journal of Biological Science**, v. 1 (Suppl3), p. 176-179, 2005.

FERREIRA, D. F., SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, E. P. B. et al., Diversidade de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife**, v. 4, p.140-148, 2009.

FETT, W. F.; OSMAN, S. F.; DUNN, M. F., Auxin production by plant pathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p.1839-1845, 1987.

FIALHO, M. B. et al., Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 925–32, 2010.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al., Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**. 1ª. ed. Berlin: Springer-Verlag. v. 18, p. 45-68, 2010.

FREITAS, S. S., Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v. 13, p. 31-34, 1989.

- FREITAS, S. S.; DE MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P., Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.
- FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I., Rizobactérias e promoção do crescimento em plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.
- FRENCH, R. C., Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 277-288, 1992.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. E. et al., *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.
- FUNKE, G. et al., Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. **Journal of Clinical**, v. 36, p. 1948–1952, 1998.
- GANDRA, E. A. et al., Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F., et al., Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 35, p. 729-737, 2011.
- GARCIA, J. A. L. et al., Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: Relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. **Journal Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 239-251, 2004.
- GASONI, L. et al., Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 108, p. 530-535, 2001.
- GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L., Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 11-28, 1994.
- GERHARDSON, B., Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

- GEVERS, D. et al., Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Journal - Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 361, p. 1911–1916, 2006.
- GLASS, N. L.; KOSUGE, T., Role of indole acetic acid lysine synthetase in regulation of indole acetic acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae* subsps. *avastanoi*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 2367–2373, 1988.
- GLICK, B. R., The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109-117, 1995.
- GLICK, B. R. et al., Biochemical and Genetic Mechanisms used by Plant Growth Promoting Bacteria, **Imperial College Press**: London, 267 p., 1999.
- GOMES, A. M. A. et al., Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 699-703, 2003.
- GOMES, V. M. et al., Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 45-50, 2011.
- GONZÁLEZ-LÓPEZ J, et al., Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acid**, v. 28, p. 363-367, 2005.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P., Colorimetric estimation of indole acetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.
- GORIS J.; KERSTER K.; DE VOS P., Polyamine Distribution Among Authentic *Pseudomonads* and *Azotobacteraceae*. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 21, p. 285-290, 1998.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L., Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.
- GRIFFITHS, G., et al., Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. **International Journal of Cell Biology**, v. 127, p. 1557-1574, 1994.

HAAHTELA, K. et al., Morphological and physiological characteristics and lipopolysaccharide composition of N₂-fixing (C₂H₂-reducing) root-associated *Pseudomonas* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 874-880, 1983.

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

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R., Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant Soil**, v. 316, p. 13-24, 2009.

HARTHMANN, O. E. L. et al., Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, nº. 2, p. 462-465, 2010.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W., Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 916-923, 1983.

HAYAT, R. et al., Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 579-598., 2010.

HICKMAN, F. W.; et al., Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* subgroup 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, nº.6, p. 1097-1102, 1982.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B., Molecular Systematics, 2nd edn. **Sinauer Associates, Sunderland**. MA: Sinauer; pp. 321-381, 1996.

HOLFORD, I. C. R., Soil phosphorus: its measurement and, its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, n. 3, p. 227-239, 1997.

HONDA, N. et al., Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. **Biotechnology Letters**, v. 20, nº. 7, p. 703-705, 1998.

HOWDEN, A. J. M. et al., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 857-865, 2009.

HOWEL, C. R.; STIPANOVIC, R. D., Supression of *Phyrium ultimum*-induced damping off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* e its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology**, v. 70, p. 712-715, 1980.

HUMPHRIS, S. N. et al., The effects of volatile secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 215-219, 2002.

HUSSAIN, A; VANCURD, V., Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. *Folia Microbiol.*, v. 15 p. 468 – 478, 1970.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Acesso em: 07 de fevereiro 2013.

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10496016.pdf>, Acesso em: 09 de novembro, 2012.

<http://www.biomerieux.pt> , Acesso em: 05 de março, 2012.

<http://www.macrogen.com/> 908 World Meridian, #60-24, Gasan-dong, Geunchun-gu - Seoul 153-781, South Korea. Acesso em: 09 de novembro, 2012.

IDRISS, E. E., et al., Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. **Microbiology**, 148, 2097–2109, 2002.

INGRAM, L.; BUTTKE, T., **Adv. Microbial Physiol.** v. 25, p. 253–300, 1984..

ISHIDA, T. et al., genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 59, p. 365–386, 2008.

IWAMOTO, T. et al., Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE, **Journals - Federation of European Microbiological Societies; Microbiology Ecology**, v. 32, p.129-141, 2000.

JACOBS, A.; CHENIA, H. Y., Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolate from South African *Oreochromis mossambicus* fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1957-1966, 2009.

JAGADEESH, K. S.; KRISHNARAJ, P. U.; KULKARNI, J. H., Suppression of deleterious bacteria by rhizobacteria and subsequent improvement of germination and growth of tomato seedlings. **Current Science**, v. 91, n^o. 11, p. 1458-1459, 2006.

JAMNIES, G.; DE VOS, D. A., Review of Current and Future Molecular Diagnostic Test for Use in the Microbiology Laboratory. In: O'CONNOR, L. **Methods in Molecular Biology - Diagnostic Bacteriology**. Totowa: Humana Press, V. 345, Ed. 2, p. 1-21 disponível em: Springer-Link Protocols –www.springerlink.com. 2009.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L., 16S rRNA gene sequence for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n^o.9, p. 2761-2764, 2007.

JAVED, I., et al., Production, characterization and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium*. IJ-31. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 44-52, 2010.

Jill E.; Clarridge III., Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases . **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, pp. 840-862, 2004

JOSEPH, B.; RANJAN PATRA, R.; LAWRENCE, R., Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v. 1, n. 2, p. 141-152, 2007.

KAI, M. et al., Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 351–360, 2007.

KANG, S. C, H. A. C. G.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K., Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science**. v. 82(4), p. 439-442, 2002.

KAPULNIK, Y., Plant growth promoting by rhizosphere bacteria. Plant roots the hidden half. **Ed Marcel Dekker, New York, USA**, 869-887 p., 2002.

KATZNELSON, H.; BOSE.; B., Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 79–85, 1959.

KAVINO, M. et al., Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 71-77, 2010.

KEROVUO, J. et al., Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 64, p. 2079-2085, 1998.

KHALID, A. et al., Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal Soil Research**, v. 42, p. 921–926, 2004.

KHAN, M. S. et al., Functional Diversity among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: *Microbial Strategies for Crop Improvement*, KHAN, M. S., A. ZAIDI AND J. MUSARRAT (Eds.). **Springer, Berlin, Heidelberg**, pp: 105-132, 2009.

KHAN, M. S. et al., Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A., Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G. A., Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils, Berlin**, v. 26, p. 79-87, 1998.

KIMURA, M., "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; PODILE, A. R., Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 260-268, 2005.

KLISH, M. A. et al., Influence of iturin A on mycelia weight and aflatoxin production by *Aspergillus favus* and *Aspergillus parasiticus* in shake culture. **Mycopathologia**, v. 123, p. 35 -38, 1993.

KLOEPPER J. W., Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. **Phytopathology**, v. 73, p. 217-219, 1983.

KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N., MILLER, T. D., Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopatology**, St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1078-1082, 1980.

KLOEPPER, J. W. et al., Plant root-bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 28, p. 21-26, 1999.

KLOEPPER, J. W.; SCHORTH, M. N., Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology, Saint Paul**, v. 71, p. 642-644, 1981.

KLOEPPER, J. W. et al., Plant growth mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Gregan, B. (Eds.), The rhizosphere and plant growth, 14. **BARC Symposium**, pp. 315–326, 1991.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH M. N., Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. **Bacteria Angers**. p. 879-882, 1978.

KLUGER, M. J., Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 93-127, 1991.

KOBAYASHI, M. et al., Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proceedings National Academics Science**, v. 92, p. 714–718, 1995.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J. W.; REDDY, M. S., Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 91– 41 - 100, 2006.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGET, M. E., Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 199-228, 1989.

KUMAR, B. S. D., Disease suppression and crop improvement through *fluorescens pseudomonads* isolated from cultivated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 735-741, 1998.

KUMAR, C. D. et al., Insights of the *fluorescent pseudomonads* in plant growth regulation. **Current Science**, v. 97, N° 2.25, p 170-179, 2009.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M., Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p.150-163, 2004.

KUNOH, H., Endophytic *actinomycetes*: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 249–252, 2002.

LACAVA, P. T. et al., Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 521-528, 2008.

LAMBRECHT, M. et al., Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298-300, 2000.

LANNA FILHO, R; FERRO, H. M; PINHO, R. S. C., Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis* Revista Tropica – **Ciencias Agrarias e Biologicas**, v. 4, nº. 2, p. 12, 2010.

LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F. J.; MUNOZ F. X., Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1205-1217, 2007.

LEBBADI, M. et al., Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* . M-4. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 49–53, 1994.

LEINHOS, V., VACEK, O., Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat and rye. **Microbiology Research**, v. 149, p. 31-35, 1994.

LUCON, C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HAKAKAVA, R., Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

LUSTER, J. et al., Sampling, defining, characterizing and modeling the rhizosphere-the soil science tool box. **Plant Soil** , v. 321, p. 457-482, 2009.

LUZ, W. C., Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 597-600, 2001.

LUZ, W. C., Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.16-20, 2001a.

LUZ, W. C., Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W. C. et al. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v. 4, p.1-49, 1996.

LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M., Substrate flow in the rhizosphere. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere e plant growth**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 129, n. 1, p. 1-10, 1991.

MAFIA, R. G. et al., Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and *Eucalypts* sp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

MANO, Y. et al., The AMI1 gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p.25–32, 2010.

MANOS, J.; BELAS, R., The genera *Proteus*, *Providencia*, e *Morganella*. **Prokaryotes**, v.6, p. 245-269, 2006.

MANSOOR, F., V. SULTANA; S. EHTESHAMUL-HAQUE, Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against root rot of mungbean by a medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. Pak. **J. Bot.**, v. 39, p. 2113-2119, 2007.

MARIANO, R. L. R., Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.

MARIANO, R. L. R; SILVEIRA, E. B., **Manual de práticas em fitobacteriologia**, 2ª ed. Recife: UFRPE. 184 p., 2005.

MARIANO, R. et al., Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.1, 91 p. 2004.

MARIN, V. A.; LEMOS, A. A.; FREITAS, E. I., Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p 46-50, 2006.

MARLONY, B. et al., Standarization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **Int. J. Food. Microbiol**, v. 83, p. 39-48, 2003.

MASSENSINI, A. M. et al., Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de Glyphosate. **Planta daninha [online]**, vol. 26, n. 4, pp. 815-823, 2008.

MATILLA, M. A. et al., Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 5, p. 1290, 2011.

MATSUMOTO, L. S. et al., Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 57-65, 2005.

MCFARLAND, J., The nephelometer: Na instrument for estimating the number of bactéria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. In: CAMPBELL, H.D.; GARVEY, S.J.; CREMER, E.N.; SUSSDORF, H.D. (Eds.). **Methods in immunology**, Benjamin. New York, p. 435-437, 1970.

MEDINA, A. et al., The growth enhancement of clover by *Aspergillus*-treated sugar beet waste and *Glomus mosseae* inoculation in Zn contaminated soil. **Applied and Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 87-98, 2006.

MELLO, I. S., Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.) **Ecologia microbiana**, Brochura: Embrapa Meio Ambiente, p. 88-112, 1998^a.

MELLO, I. S., Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, v. 1, p. 17-67, 1998^b.

MELLO, M. F. et al., Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Phytopatologica, Jaguariúna**, v. 38, n. 3, p. 50-60, 2002.

MELO, L. S. DE; VALARINI, P. J., Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.); **Scientia Agricola, Piracicaba**, v.52 (2), p. 326-330 mai./agos, 1995.

MICHAEL, A. H.; NELSON, P. E., Antagonistic Effect of Soil Bacteria on *Fusarium roseum* "Culmorum" from Carnation. **Phytopathology**, 62: Lancaster, v. 62, p. 1052-1056, 1972.

MICHIELS, K., CROES, C.; VANDERLEYDEN, J., Two different modes of attachment of *Apospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 137, P. 2241-2246, 1991.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P., 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 574-581, 2006.

MIGULA, W., Üeber ein neues System der Bakterien. **Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe**, Bd v. 1, p. 235-238, 1849.

MILLER, H. J., HENKEN, G., VAN VEEN, J. A., Variation and composition of bacterial population in the rhizospheres of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 656-660, 1989.

MIRANSARI, M., Soil microbes and plant fertilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92(5), p. 875-885, 2011.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J., Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O., Rizosfera. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª. ed., Lavras, UFLA, p. 407-448, 2006.

MORRIS, R. O., Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. **Plant Hormones** (Davies PJ, eds), **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, p. 318-339, 1995.

NAKASONE, Y. et al., Transient dimerization and conformational change of a BLUF protein: YcgF. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 7028–7035, 2007.

NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V., IAA synthesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Current science**, v. 38, p. 517-518, 1996.

NAUTIYAL, C. S., An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters**, v. 170 (436), p. 265-270, 1999.

NOCKER A.; BURR, M.; CAMPER, A. K., Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 276–289, 2007.

NORMANLY, J., Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, 2010.

O'HARA, C. M., Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative *bacilli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.3, p. 928-933, 2006.

O'HARA, C. M.; MILLER, J. M., Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and other nonenteric gram-negative *bacilli* and comparison with the Vitek GNI+ card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2096-2101, 2003.

OBERHÄNSLI, T.; DE FAGO, G.; HAAS, D., Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*—Role of tryptophan side-chain oxidase. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2273–2279, 1991.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C. A., Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p.1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, A. A. R., Rizobactérias em citros; EMBRAPA CNPMF, **Agronline.com.br** 2004, Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=145>> Acesso em: 13 de maio de 2013.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I., Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 40 p. (**Embrapa Agrobiologia - Documentos**, 161). 2003.

OLIVEIRA, C. A. et al., Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1782-1787. 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F., Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciências**, n. 7, 2006.

OLSEN, N. W.; MISAGHI, I. J., Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, Sant. Paul, v. 71, p. 1006, 1981.

OREN, A; R. PAPKE, T., Molecular phylogeny of microorganisms, **International Microbiology**, v.13, p. 219-220, 2010.

OSORIO, N. W., A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Faculdade Nacional Agronomia, Medellín** v.60(1), p. 3621-3643, 2007.

OTTO-KARG, I. et al., Validation of Vitek 2 Nonfermenting Gram-Negative Cards and Vitek 2 Version 4.02 Software for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Nonfermenting Gram-Negative Rods from Patients with Cystic Fibrosis? **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3283–3288 v. 47, 2009.

OUYANG, J.; SHAO, X.; LI, J., Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 24, p. 327–333, 2000.

PAL et al., Antifungal characteristics of a *fluorescent Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Research in Microbiology**, v. 155 (Suppl 3): p. 233-242. 2000.

PAN, B. et al., Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 11, p. 179-186, 1999.

PANHWAR, Q. A. et al., effect of Phosphatic Fertilizer on Root Colonization of Aerobic rice by Phosphate- Solubilizing Bacteria. Proceedings of International Conference on **Food Engineering and Biotechnology**, v. 9, p. 145-149, 2011.

PATEL, K. J.; ARCHANA, G., Phytate mineralization by native soil flora and diversity of phytate mineralizing rhizobacteria and their application for plant growth promotion. En: Abstracts of the First Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture. S. Desai, M. S. Reddy, V. Krishna Rao, Y. R. Sarma, B. Chenchu Reddy, K.R.K. Reddy (Eds.) **Hyderabad, ANGRAU**. 133 p., 2009.

PATEL, D. K., ARCHANA G.; NARESH KUMAR G., Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. in the presence of different sugars. *Current Microbiology* v. 56(2), p. 168-74, 2008.

PATERNOSTER, T. et al., Selection of a biocontrol agent based on a potential mechanism of action: degradation of nicotinic acid, a growth factor essential for *Erwinia amylovora*. **International Microbiology**, v. 13, p. 195-206, 2010.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R., Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 207–220, 1996.

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

PAULA, M. A. et. al., Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, p. 61–66, 1992.

PEDRAZA R. O., Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiol Lett.** v. 233:15–21, 2004.

PEIX, A. et al., *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2067-2072, 2003.

PEREIRA, R. M. et al., Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p.1921-1927, Sep./Ouc. 2008.

PERET, B.; et al., *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 399–408, 2009.

PERLEY, J. E.; STOWE, B. B., On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. **Plant Physiol.** Feb; v. 41(2): p. 234–237, 1966.

PETTI, C. A., Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1108-1114, 2007.

PETTIT, G. R. et al., "Antineoplastic Agents 560. Isolation and Structure of Kitastatin 1 from an Alaskan *Kitasatospora* sp., **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1069-1072, 2007.

PICARD, C. et al., Frequency and biodiversity of B2,4-diacetyl phloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 948–955, 2000.

PIETERSE, C. M. J. et al., Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

PINTO, Z. V. et al., Podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v. 37, n. 4, p. 180-186, 2011.

PINTON, R. et al., Caracterização morfo cultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças; **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 45, n. 3, p. 284-293, mar. 2010.

PITTS, R. J.; CERNAC, A.; ESTELLE, M., Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 16, p. 553–560, 1998.

POLLMANN, S.; MULLER, A.; WEILER, E. W., Many roads lead to "auxin": of nitrilases, synthases, and amidases. **Plant Biology**, v. 8, p. 326–333, 2006.

POLONENKO, D. R. et al., Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33: p. 498±503, 1987.

POTERA, O., From bacteria: A new weapon against fungal against fungal infection. **Science**, v. 265, p. 605, 1994.

PRINSEN, E. et al., *Azospirillum brasiliense* indole-3- acetic acid biosynthesis: evidence for a non- tryptophan dependet pathway. **Annual Power Symposium Series**, v. 6, p. 609-615, 1993.

PÜHLER, A. et al., What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions?, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 137-147, 2004.

PUNJA, K., Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, p. 315–23, 1997.

RAHMAN, A. et al., Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. **Plant Physiology**, v. 130, p.1908–1917, 2002.

RAMM, A., et al., Efeito da microbiolização de sementes sobre o vigor de plântulas de canola; **21º Congresso de Iniciação Científica|4ª Mostra Científica| Universidade Federal de Pelotas**, 2012.

REIS, M. R. et al., Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 26, p. 323-331, 2008.

REZENDE, D. C. et al., Compostos orgânicos voláteis fúngicos no controle de fitopatógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 18, p. 276-302, 2010.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A., Soil isolantes of *Pseudomonas* spp. That utilize inositol phosphates. **Canadian Journal Microbiology, Ottawa**, v. 43, p. 509-516, 1997.

RICHARDSON, E. A., Regulating the phosphorus nutrition of plants: molecular biology meeting agronomic needs. **Plant and Soil, The Hague**, v. 322, p. 17-24, 2009.

ROBBS, C. F., Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA**, p. 121- 133, 1991.

ROCHA, D. R.; FORNASIER FILHO, D.; BARBOSA, J. C., Efeitos da densidade de plantas no rendimento comercial de espigas verdes de cultivares de milho. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 392-397, 2011.

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

RODRÍGUEZ, H. et al., Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant Soil**, v. 287, p. 15-21, 2006.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O., Controle Biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, n. 1, p. 195 -228, 2003.

ROSALES, A., et al., Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 85, p.1028–1032, 1995.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V., Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p.1-30, 2011.

SALKOWSKI, I. N.; EHMANN, A., The van urk-salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives **Journal of Chromatography**, v. 132, p. 267-276, 1977.

SANTOS, I. et al., Resíduos orgânicos e solarização para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. In: Bettiol, W., Morandi, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 209-223, 2009.

SANTOS, M. M. et al., Seleção de rizobactérias com a capacidade de promover crescimento em melancia (*Citrullus lanatus* L.). **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 1544-1548, 2008.

SARAVANAKUMAR, D. et al., PGPR induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. **Crop Protection**, v. 26, p. 556-565, 2007.

SARWAR, M.; FRANKENBERGER, W. T., Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. **Plant and Soil**, v. 160 (Suppl 1), p. 97-104, 1994.

SAYYED, R. Z. et al., Siderophore production by *Alcaligenes faecalis* and its application for growth promotion in *Arachis hypogea*, **Indian Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 302-307, 2010.

SCHROTH, N. M; HANCOCK, J. G., Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v. 215, p. 1376-1381, 1982.

SEKINE, M.; WATANABE, K.; SYONO, K., Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 1718 –1724, 1989.

SELVAKUMAR, G. et al., Characteristic and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGPSB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 525-534, 2007.

SEWARD, R. et al., The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition. **Journal- Institute of Brewing**, v.102, p. 439–443, 1996.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S., Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Journal Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 260–268, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C., Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311-329, 2000.

SILVA, E. G. et al., Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, 5, p. 377-383, 2008.

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**, Berlin, v. 151, p. 42-46, 2003.

SILVA, J. R. C. et al., Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, jul./ago, 2008.

SILVA, J. R. et al., Potencialidade de rizobactérias promotoras de crescimento na cultura do melão. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2010.

SILVA, V. N. et al., Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, p. 95-99, 2006.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S., Microbiota do solo e qualidade ambiental/editoras **Campinas: Instituto Agrônomo**, 312 p.: Il. 2007.

SILVEIRA, A. P. D. et al., Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 19, p. 205-211, 1995.

SILVEIRA, E. B., Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). *Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável*, Recife, **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2001.

SINGH, S.; KAPOOR, K. K., Inoculation with phosphate solubilising microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and fertility of soils**, v. 28 (2): p. 139-144, 1999.

SOERGEL, D. A. W. et al., Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences; **Journal List >International Society for Microbial Ecology, Journal PubMed Central Canada>PMC3379642**, 2012.

SOKOLOVA, M. G.; AKIMOVA, G. P.; VAISHLYA, O. B., Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied* **Biochemistry and Microbiology**, v. 47(3), p. 274-278, 2011.

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

SOUCHIE, E. L. et al., Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, Nov. 2005.

SOUSA, C. S. et al., Actinobacterias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.12, p.1759-1766, 2006.

SOUZA, M. L. DE, Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 21, p. 28-31, 2001.

SPAEPEN, S; VANDERLEYDEN, J; OKON, O., Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 283- 320, 2009.

SPAEPEN, S. et al., Indole-3-acetic acidin microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J., Auxin and Plant-Microbe Interactions, **Cold Spring Harb Perspect Biology**, v. 3, p.a001438, 2011.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B., Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobiumetli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology, Ottawa**, v. 42, n. 10, p. 1006-1014, 1996.

STACKEBRANDT, E., et al., Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

STEVENSON, I. L., Antibiotic activity of actinomycetes in soil and their controlling effects on root-rot of wheat. **Jounal General Microbiology**, reading, v.14 p.440-448, 1956.

TAIZ, L.; ZEIGER, E., **Fisiologia Vegetal**, 3 (ed.). Artmed Editora. p.720, 2004.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M., Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

- TAMURA, K. et al., MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24(8), p. 1596-9., 2007.
- TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K., Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Review Molecular and Cellular Biology**, v. 7, p. 847–859, 2006.
- TEIXEIRA, D. A. et al., Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.118-123, 2007.
- THENUIS, M. et al., Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p.1153–1161, 2004.
- THRANE, C. et al., Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. **Federation of European Microbiological Societies: MicrobiologyEcology**, v. 33, p. 139-146, 2000.
- TIWARI, P.; EKKA, S. R.; TRIPATHI, J., In Vitro Study of *Pseudomonas* spp. Isolated from Soil; **Journal of Phytology**, v. 3(4), p. 21-23, 2011.
- TORRES M. V., LIZARAZO L. M., Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). **Agronomía Colombiana**, v. 24(2), p. 317-325. 2006.
- TRIPURA, C.; SASHIDHAR, B.; PODILE, A. R., Ethyl methanesulfonate mutagenesis-enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. **Current Microbiology**, v. 54, p. 79-84, 2007.
- TSAVKELOVA, E. A. et al., Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, v. 188 (Suppl 6), p. 655-664, 2007.
- TYSON, G. W. et al., Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, 438, 37–43, 2004.
- UNNO, Y. et al., Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 396-404, 2005.

UTKHEDE, R. S.; RAHE, J., Elnteractions of antagonistas and pathogens in biological control of onion white rot. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 890-893, 1983.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B. D., Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Foz do Iguaçu: Kluwer **Academic Publishers**, p. 3-8. 2000.

VAN LOON, L. C.; BAKK, E. R. P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J., Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36 , n. 1, p. 4 53 – 483, 1998.

VASCONCELLOS R. L. F.; CARDOSO, E. J. B. N., Rhizospheric *Streptomyces* as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, p. 807–816, 2009.

VASQUEZ, P. et al., Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460-468, 2000.

VASSILEVA, M. et al., Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes infermentation and soil conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1287-1299, 2010.

VENIERAKI, A. et al., The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 277-285, 2011.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K., Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.127-141, 2001.

VESPERMANN, A; KAI, M.; PIECHULLA, B., Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5639–5641, 2007.

WAKSMAN, S. A.; HINRICI, A. T., The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 337, 1943.

WANG, J. et al., Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. Letters in **Applied Microbiology**, v.39, p.98–102, 2004.

WANG, Q. et al., Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 7, p. 5261-7, 2007.

WAYNE, L. G. et al., International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463–464, 1987.

WEI, G.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S., Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WEISBURG, W. G. et al., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 697-703, 1991.

WEISING K. et al., DNA fingerprinting in plants and fungi. **CRC Press. Boca Ratón**, p. 44-59, Florida, USA. 1995.

WELLER, D. M., Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S., Use of rhizobacteria for biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, p. 306-311, 1993.

WENT, F. W.; THIMANN, K. V., *Phytohormones*: Macmillan, New York, 294p., 1937.

WHEATLEY, R. E., The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 357-364, 2002.

WHIPPS, J. M., Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v. 26, p. 1-133, 1997.

WHITELAW, M. A., Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.

WOESE, C. R., Bacterial evolution, **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOO, P. C. et al., Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1996-2001, 2003.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B., Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p.707–735, 2005.

WU, D. et al., An automated phylogenetic tree-based small subunit rRNA taxonomy and alignment pipeline (STAP). **PLoS One** v.3: p. 2566. 2008.

XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R., Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, v.32, p.67-71, 1996.

YABUUCHI, E. et al., Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YAMADA, E. A. et al., Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v.16, p.423-432, 2003.

YEE, D. C.; MAYNARD, J. A.; WOOD T. K., Rhizoremediation of Trichloroethylene by a Recombinant, Root-Colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain Expressing Toluene *ortho*-Monooxygenase Constitutively **Applied And Environmental Microbiology**, v. 64, p. 112–118, 1998.

YOUNG, J. P. Y. et al., Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., (1998) as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89-103, 2001.

YUEN, G. Y.; SCHROTH, M. N., Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. **Phytopathology, Saint Paul**, v. 76, p. 176-180, 1986.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G., *Pseudonomas* spp. *Fluorescentes* – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 32 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127), 2000.

ZHANG, C. et al., *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Hetero rhabditoides schongmingensis* (Rhabditida:Rhabditidae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1603-1608, 2009.

ZHANG, R. et al., Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p.1070–1077, 2008.

ZHAO, Y., Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p.49–64, 2010.

ZHUANG, X. et al., New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment International**, v. 33, p. 406-413, 2007.

ZULUAGA C., BURITICÁ P. Y MARÍN M., Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana utilizando secuencias del ADN ribosomal 28S. **Journal of Tropical Biology**, v. 59, p. 1-24, 2011.